

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
des Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

Regulation der Transkription durch PPAR β/δ in Zelltypen des Tumorstroma

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt



von
Markus Rieck
aus Königswinter

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs: 17. Oktober, 2008

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Sabine Müller-Brüsselbach

1. Koreferent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

***„Ein großer Teil des Fortschreitens
besteht darin, dass wir fortschreiten wollen“***

Lucius Annaeus Seneca 1 - 65 n. Chr.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kernrezeptoren	1
1.2	Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)	3
1.2.1	Struktur	5
1.2.2	Isoformen.....	5
1.2.3	Expressionsprofil	6
1.2.4	Regulation der Transkription	6
1.2.4.1	Heterodimerisierung und DNA-Bindung	6
1.2.4.2	Co-Faktoren.....	7
1.2.5	Liganden	9
1.2.5.1	Liganden-bindende Proteine	11
1.2.6	Posttranslationale Modifikationen	12
1.2.7	Biologische Funktionen	13
1.2.7.1	PPAR α	13
1.2.7.2	PPAR γ	15
1.2.8	PPAR β	17
1.2.8.1	PPAR β spezifische Regulation der Transkription	17
1.2.8.2	Biologische Funktionen.....	18
1.2.8.2.1	Lipid- und Glukosemetabolismus.....	18
1.2.8.2.2	Reverser Cholesteroltransport.....	20
1.2.8.2.3	Arteriosklerose.....	20
1.2.8.2.4	Plazentaentwicklung.....	21
1.2.8.2.5	Reifung von Oligodendrozyten und Myelinisierung	21
1.2.8.2.6	Differenzierung von Präadipozyten.....	22
1.2.8.2.7	Differenzierung von Panethzellen im Dünndarm	22
1.2.8.2.8	Keratinozytendifferenzierung und Wundheilung	23
1.2.8.2.9	Tumorigenese.....	23
1.2.8.3	PPAR β Maustumormodell	25
1.3	Ziel der vorliegenden Arbeit	28
2	MATERIAL UND METHODEN	29
2.1	Biochemische und molekularbiologische Methoden.....	29
2.1.1	DNA und RNA Standardmethoden	29
2.1.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab (Midipräp).....	29
2.1.1.2	Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA (Minipräp)	29
2.1.1.3	Isolierung von RNA aus Zellkulturen und Mausgeweben	30
2.1.1.4	Parallele Isolierung von RNA und Protein aus einer Probe	31
2.1.1.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.1.1.6	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	31

2.1.1.7	Gelelektrophorese	32
2.1.1.8	Wiedergewinnung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.1.1.9	Ligation.....	32
2.1.1.10	Transformation.....	33
2.1.1.11	Verwendete <i>E. coli</i> Bakterienstämme	34
2.1.1.12	Herstellen von kompetenten Bakterien	34
2.1.1.13	DNA-Sequenzierung	34
2.1.2	Computerauswertung und Datenbankanalysen	35
2.1.3	Polymerasekettenreaktion.....	35
2.1.4	Erststrang cDNA-Synthese und RT-PCR (reverse Transkription PCR)	36
2.1.5	Quantitative RT-PCR (qPCR bzw. „ <i>real-time</i> “ PCR)	37
2.1.6	Subklonierung von DNA Fragmenten	38
2.1.6.1	Klonierung von PCR Fragmenten in den pCR®2.1-TOPO® Vektor	38
2.1.7	Herstellen von Gesamtzell-Proteinextrakten	39
2.1.7.1	Herstellen von denaturierten SDS Extrakten	39
2.1.7.2	Herstellen von nativen RIPA-Extrakten	40
2.1.8	Proteinbestimmung von Gesamtzell-Proteinextrakten	40
2.1.9	Immunpräzipitation	41
2.1.10	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE).....	42
2.1.11	Western Blot Analyse	43
2.1.11.1	Elektro-Transfer	43
2.1.11.2	Immunoblot	44
2.2	Zellbiologische Methoden	45
2.2.1	Zellbiologische Standardmethoden.....	45
2.2.1.1	Verwendete Zellkulturen und Kulturbedingungen	45
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen	47
2.2.1.3	Kultivieren und Passagieren von Zellen.....	47
2.2.1.4	Zählen von Zellen	47
2.2.1.5	Mycoplasmentest mittels Hoechst DNA-Fluoreszenzfärbung.....	48
2.3	Transfektion	48
2.3.1	PEI-Transfektion	49
2.3.2	siRNA-Transfektion.....	50
2.3.2.1	Zyklischer <i>Cdkn1c</i> siRNA Knockdown	52
2.4	Luziferase-Reportergen-Analysen („Luziferaseassays“).....	53
2.4.1	LexA-System	54
2.4.2	Gal4-System	54
2.4.3	PPRE-System	55
2.5	„Pulse-Chase“ Experimente	55
2.6	Retrovirale Infektion von Zellen (Transduktion)	57
2.6.1	Herstellen von infektiösen Retroviren	57
2.6.2	Retrovirale Transduktion von Zellen ohne Selektion	58
2.6.3	Herstellen von Zelllinien mittels retroviraler Transduktion	59

2.6.4	Herstellen von Virus-produzierenden Zelllinien mit Hilfe von Helferviren	59
2.7	Retroviraler <i>in vivo rescue</i> des hyperplastischen Phänotyps der <i>Pparb</i>^{-/-} Endothelien.....	60
2.8	Erstellen von Wachstumskurven.....	61
2.9	Immunfluoreszenzfärbung	61
2.10	Mauszucht und Tierexperimente.....	62
2.10.1	Injektion subkutaner Tumore	62
2.10.2	Matrigel- <i>Plug Assays</i>	63
2.11	Reagenzien und Materialien.....	64
2.11.1	Puffer und Lösungen.....	64
2.11.2	Bakterien und Zellkulturmedien	67
2.11.3	Kits	68
2.11.4	Molekulargewichtsstandards und Nukleotide	69
2.11.5	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken	69
2.11.6	Primer und Oligonukleotide (siRNA).....	70
2.11.7	Verwendete Plasmide	74
2.11.8	Klonierungsstrategien	74
2.11.9	Radioisotope.....	74
2.11.10	Enzyme und Proteinstandards	75
2.11.11	Antikörper	75
2.11.12	Verbrauchsmaterialien.....	76
2.11.13	Chemikalien	77
2.11.14	Geräte.....	79
3	ERGEBNISSE	83
3.1	<i>In vivo rescue</i> des hyperplastischen Phänotyps von <i>Pparb</i>^{-/-} Endothelien in Matrigel-<i>Plugs</i> ...	83
3.2	Identifizierung, Validierung und Charakterisierung potentieller PPARβ Zielgene.....	86
3.2.1	Identifizierung von Zielgenen via <i>Microarray-Analysen</i>	87
3.2.2	Identifizierung von Zielgenen durch Vergleich von Proteinprofilen.....	88
3.2.3	Validierung von putativen PPAR β Zielgenen.....	89
3.2.3.1	siRNA-vermittelter <i>Pparb</i> -Knockdown in NIH3T3 Zellen	90
3.2.3.2	Cre-vermittelter konditionaler Flox- <i>Pparb</i> Knockout in Lungenfibroblasten-Zelllinien ..	92
3.2.3.3	3xFlag- <i>Pparb rescue</i> Klone.....	94
3.2.3.3.1	Etablierung von 3xFLAG-PPAR β exprimierenden Zelllinien mittels retroviraler Transduktion	94
3.2.3.3.2	Validierung von Genen in 3xFlag- <i>Pparb</i> Klon 1 <i>rescue</i> Zellen	96
3.2.3.3.3	Validierung von Genen in 3xFlag- <i>Pparb</i> Klon #3 <i>rescue</i> Zellen	97
3.2.3.4	Validierung potentieller PPAR β Zielgene in humanen Keratinozyten (HaCaT)	98
3.2.4	Validierung potentieller PPAR β Zielgene: Zusammenfassung	99
3.2.5	Funktionelle Analyse des putativen PPAR β Zielgens Cdkn1c (p57 ^{KIP2})	102

3.2.5.1	3xFLAG-PPAR β Reexpression in A1 <i>Pparb</i> ^{-/-} Fibroblasten führt zu einer verminderten Zellproliferation	103
3.2.5.2	siRNA-vermittelter Cdkn1c Knockdown vermindert den Selektionsdruck auf 3xFLAG-PPAR β exprimierende A1 <i>Pparb</i> ^{-/-} Fibroblasten	105
3.3	Regulation von PPARβ durch natürliche und synthetische Liganden	107
3.3.1	<i>all-trans</i> Retinsäure (<i>atRA</i>) ist kein natürlicher Ligand für PPAR β <i>in vitro</i>	109
3.3.2	<i>all-trans</i> Retinsäure ist kein natürlicher Ligand für PPAR β <i>in vivo</i>	112
3.4	Einfluss von Transportproteinen auf die Ligandenaktivierung von PPARβ	115
3.5	Modifikationen an PPARβ	118
3.5.1	SUMOylierung	118
3.5.2	Ubiquitinierung	119
3.5.3	Einfluss von GW501516 auf die Proteinstabilität von PPAR β	121
4	DISKUSSION	125
4.1	<i>In vivo rescue</i> des hyperplastischen Phänotyps in <i>Pparb</i>^{-/-} Endothelzellen	126
4.2	Validierung potentieller PPARβ Zielgene	127
4.2.1	<i>Cdkn1c</i>	128
4.2.2	<i>Cd36</i> und <i>Thbs2</i>	130
4.2.3	<i>Igfbp3</i>	131
4.2.4	<i>Clic1</i> und <i>Clic4</i>	133
4.2.5	<i>Rbp1</i>	135
4.2.6	Weitere PPAR β regulierte Zielgene: <i>Angptl4</i> , <i>PPARγ</i> , <i>Fabp4</i>	136
4.2.7	<i>all-trans</i> Retinsäure ist kein natürlicher Ligand von PPAR β <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	139
4.3	Einfluss von Transportproteinen auf die Liganden-abhängige Aktivierung von PPARβ Zielgenen	142
4.4	Posttranslationale Modifikation von PPARβ	143
4.4.1	SUMOylierung	143
4.4.2	Ubiquitinierung	144
4.4.3	Auswirkungen der Überexpression von PPAR β	146
4.5	Ausblick	146
5	ZUSAMMENFASSUNG	148
6	SUMMARY	150
7	LITERATURVERZEICHNIS	152

8	ANHANG	173
8.1	Lebenslauf	173
8.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	174
8.3	Publikationen	175
8.4	Danksagungen.....	176
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	178

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Schematische Darstellung der Grundstruktur von Kernrezeptoren.....	3
Abb.1.2	Proteinsequenz sowie grundsätzliche strukturelle Elemente der drei humanen PPAR Subtypen.....	4
Abb.1.3	Liganden-abhängige Transkriptionsregulation durch PPAR:RXR Heterodimere.....	8
Abb.1.4	Wachstum von LLC-Tumoren in Wildtyp- und PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen.....	25
Abb.1.5	Immunhistologische Analyse von Endothelzellen (EC) in LLC-Tumoren.....	26
Abb.1.6	In vivo Angiogenese Assay in Pparb ^{+/+} und ^{-/-} Mäusen.....	27
<hr/>		
Abb.2.1	Zeitlicher Ablauf des zyklischen Cdkn1c siRNA Knockdowns.....	53
<hr/>		
Abb.3.1	Retrovirale Pparb Reexpression in Pparb ^{-/-} -Mäusen führt zu einer morphologisch normalen Gefäßausbildung.....	85
Abb.3.2	siRNA-vermittelter Pparb-Knockdown in NIH3T3 Zellen.....	91
Abb.3.3	Expression von Pparb sowie von potentiellen Zielgenen nach siRNA Knockdown von Pparb in NIH3T3 Zellen.....	91
Abb.3.4	Expression von Pparb und potentiellen PPAR β Zielgenen in konditionalen Flox-Pparb Knockout Zellen.....	93
Abb.3.5	3xFLAG-PPAR β Expression in neu etablierten 3xFlag-Pparb rescue Klonen	95
Abb.3.6	Expression von Pparb und potentieller PPAR β Zielgene in pLPCX #L2 und 3xFlag-Pparb #1 rescue Zellen.....	96
Abb.3.7	Expression von PPARb und potentiellen PPAR β Zielgenen in humanen Keratinozyten (HaCaT).....	99
Abb.3.8	PPAR β -abhängige Wachstumsinhibition in 3xFlag-Pparb #1 Fibroblasten.....	103
Abb.3.9	Expression von Pparb, Cdkn1c und Angptl4 in unterschiedlichen Passagen des 3xFlag-Pparb #1 und pLPCX #L2.....	104
Abb.3.10	Auswirkungen des Cdkn1c Knockdowns auf den wachstumsinhibierenden Effekt von PPAR β in 3xFlag Pparb #1 Zellen.....	105
Abb.3.11	Vergleich der Transaktivierung von LexA-PPAR β durch verschiedene Liganden.....	108
Abb.3.12	Expressionsniveau von Pparb, Fabp5 und Crabp2 in NIH3T3 Zellen.....	109

Abb.3.13	All-trans Retinsäure (atRA) ist kein Ligand von PPAR β im LexA-System und Gal4-System.....	110
Abb.3.14	All-trans Retinsäure (atRA) ist kein Ligand für PPAR β in einem PPREGekoppelten Reportergenassay.....	112
Abb.3.15	Liganden-abhängige Induktion von PPAR β Zielgenen in humanen Keratinozyten (HaCaT).....	113
Abb.3.16	PPAR β Zielgene zeigen keine atRA-abhängige Induktion in murinen Fibroblastenzelllinien.....	114
Abb.3.17	siRNA-vermittelter Genknockdown von Fabp5 in NIH3T3 Zellen.....	116
Abb.3.18	Einfluss des Fabp5 Knockdowns auf die Aktivierung von PPAR β Zielgenen durch verschiedene Liganden.....	117
Abb.3.19	Konservierte und nicht-konservierte PPAR γ SUMOylierungsstellen.....	119
Abb.3.20	Liganden-abhängige Ubiquitinierung von überexprimiertem PPAR β	120
Abb.3.21	Liganden abhängiger PPAR β -Proteinumsatz nach transienter Überexpression.....	122
Abb.3.22	Proteinumsatz von moderat exprimiertem 3xFLAG-PPAR β in retroviral transduzierten Mausfibroblasten.....	123
<hr style="width: 20%; margin: 10px auto;"/>		
Abb.4.1	PPAR β -abhängige Regulation von Cdkn1c, Thbs2 und Cd36 und deren Einfluss auf das Wachstum und die Migration von Endothelzellen (ECs).....	131
Abb.4.2	IGFBP3-abhängige, antiproliferative Regulationsmechanismen.....	133
Abb.4.3	Einfluss von PPAR β Zielgenen auf Wachstum und Differenzierung von Endothelzellen.....	138
Abb.4.4	Modell der Transkriptionsregulation von Ucp2, Ucp3 und Cpt1b durch PPAR β /KLF5 Komplexe im Skelettmuskel.....	143

Tabellenverzeichnis

Tab.3.1	Microarray-Analyse von differenziell exprimierten Genen von Pparb ^{+/+} und Pparb ^{-/-} Zellen aus Matrigel-Plugs.....	88
Tab.3.2	Durch Vergleich von Proteinprofilen von Pparb ^{+/+} und Pparb ^{-/-} Lungenfibroblastenzelllinien identifizierte, differenziell exprimierte Proteine	89
Tab.3.3	Gesamtübersicht über die Expression von potentiellen PPAR β Zielgenen sowie PPAR- und RXR-Subtypen in verschiedenen zellulären in vitro Testsystemen.....	101

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ABCA1	„ATP-binding cassette transporter“
<i>Adrp</i>	„adipose differentiation-related protein“
AKT	RAC-alpha serine/threonine kinase; Proteinkinase B
<i>Angptl4</i>	„angiopoietin-like 4“
AP-1	activator protein-1
APC	Adenomatous polyposis coli
Bak	Bcl2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB binding protein
CDK	„cyclin-dependent kinase“
<i>Cdkn1c</i>	Cdk-Inhibitor 1c (Gen codierend für p57 ^{KIP2})
cDNA	„complementary DNA“
CLIC	Chloridionenkanal
Cox	Cyclooxygenase
cPGI	Carbaprostazyklin
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
<i>Cpt1a</i>	Carnitinpalmitoyltransferase 1α
Cre	„cyclisation recombination“-
CTE	„carboxy terminal extension“
C-Terminus	Carboxyterminus
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	„direct repeats“
EC(s)	Endothelzelle(n)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Estrogen Receptor
ERK	„extracellular-signal related kinase“
<i>et al.</i>	<i>et alter</i> (und andere)
FAAR	„fatty acid activated receptor“, Synonym für PPARβ/δ
FABP	„fatty acid binding protein“
FCS	„fetal calf serum“ (Fetales Kälberserum)
FGF	„fibroblast growth factor“
Fos	„FBJ murine osteosarcoma virus“
G	Guanin
GF	„growth factor“ Wachstumsfaktor
GR	Glucocorticoid Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
h	human (Mensch)
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDL	„high density lipoprotein“

Hek	„human embryonic kidney“
His	Histidin
HNF-4	„hepatocyte nuclear factor 4“
hRas	„harvey rat sarcoma virus“
HRE	„Hormone response element“
I-κB	„Inhibitor of Nuclear factor κB“
IGF	„insulin-like growth factor“
IGFBP3	„insulin-like growth factor binding protein 3“
IMT	Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (Universität Marburg)
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kRas	„kirsten rat sarcoma virus“
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LBP	„lipid binding protein“
LDL	„low density lipoprotein“
LLC	„lewis lung carcinoma“
Lsg.	Lösung
LTR	„Long terminal repeat“
LXR	Leber X Rezeptor
m	Milli-
m	murin (Maus)
MAPK	„mitogen activated protein kinase“
MDa	Megadalton
Mg	Milligramm
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mock	Schein (z. B. Negativkontrolle mit einer Scheinbehandlung)
mPPARβ	murines (Maus) PPARβ (PPAR s. u.)
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
N	Nukleotid (A,G,C, oder T)
N-CoR	„nuclear receptor co-repressor“
NF-κB	„nuclear factor-κB“
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminal
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PGC-1	PPARγ coactivator-1
PGE₂	Prostaglandin E ₂
pH	Wasserstoffexponent (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B (AKT)
PKC	Proteinkinase C
PPAR	„peroxisome proliferator activated receptor“
PPRE	„peroxisome proliferator response element“
Q-PCR	quantitative PCR (real-time PCR)
RA	Retinoic Acid (Retinsäure)
RAR	„retinoid acid receptor“
RARE	„RA response element“
Ras	„rat sarcoma virus“
Rbp1	„retinol-binding protein 1“
RIPA	„radio immuno precipitation assay“
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RLU	„relative light unit“
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)

ROR	„retinoid-related orphan receptor“
Rpl27	„ribosomal protein L27“
Rplp0	„ribosomal protein, large P0“
RT	Raumtemperatur
RXR	„Retinoid X receptor“
s	Sekunde(n)
s.	Siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SHARP	„SMRT/HDAC I-associated repressor protein“
SMRT	„silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor“
SRC	„steroid receptor coactivator“
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TGFβ	„transforming growth factor β“
THBS2	Thrombospondin 2
TK	Thymidinkinase
TNFα	„tumour necrosis factor-α“
TR	Thyroid Hormon Rezeptor
TR-FRET	„time-resolved fluorescence-resonance energy transfer“
U	Unit (Einheit der jeweiligen Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“ (Volumen/Volumen)
VDR	Vitamin D-Rezeptor
vgl.	Vergleiche
w/v	„weight per volume“ (Gewicht/Volumen)
Wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

1 Einleitung

In Deutschland und in anderen Industrienationen stellen Krebserkrankungen und Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache dar. In den vergangenen Jahren konnte in einer Vielzahl unterschiedlicher Studien der Einfluss der „*Peroxisome Proliferator-activated Receptors*“ (PPARs) auf die zugrunde liegenden Stoffwechseldysfunktionen wie Adipositas, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Arteriosklerose sowie Entzündungsreaktionen gezeigt werden.

PPARs sind Fettsäure-regulierte Transkriptionsfaktoren. In der Zelle dienen sie als Lipidsensoren und sind wichtige Regulatoren des Stoffwechsels und des Energiehaushalts. Zudem spielen sie eine zentrale Rolle bei Proliferation, Differenzierung und Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen und sind mit der Entstehung von Tumorerkrankungen assoziiert.

Im Gegensatz zu den Subtypen PPAR α und γ ist über die Funktionen von PPAR β/δ bisher nur wenig bekannt. Als potentiell pharmakologisches Ziel zur Behandlung von Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom ist die Frage nach seiner Rolle bei der Kanzerogenese jedoch von grundlegender Bedeutung.

In den nachfolgenden Kapiteln soll daher zunächst die biologische Funktion der PPARs sowie deren Rolle in den unterschiedlichen Erkrankungen im Allgemeinen vorgestellt werden. In den weiteren Kapiteln wird dann auf PPAR β/δ im Speziellen und auf dessen mögliche Rolle bei der Tumorentstehung eingegangen werden.

1.1 Kernrezeptoren

Kernrezeptoren sind Liganden-regulierte nukleäre Transkriptionsfaktoren (Aranda and Pascual, 2001). Als Liganden dienen Hormone, bioaktive Lipide aber auch andere kleine, zumeist lipophile, synthetische und natürliche organische Moleküle (Carlberg, 2004). Im humanen Genom sind 48 verschiedene Kernrezeptoren bekannt, sie bilden eine Superfamilie mit 6 phylogenetischen Untergruppen (NR-Nomenclature, 1999). Zur 1. Untergruppe (NR1...) gehören Vertreter wie der Thyroid Rezeptor (TR), die *all-trans* Retinsäurerezeptoren (RARs), der Vitamin D-Rezeptor (VDR) und auch die

PPARs (Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor). Der Rezeptor für 9cis-Retinsäure RXR (Retinoid X Rezeptor) sowie der „*hepatocyte nuclear factor 4*“ (HNF4) sind Beispiele für Vertreter der 2. Untergruppe (NR2...). Die dritte Untergruppe (NR3...) wird repräsentiert durch die verschiedenen Steroidrezeptoren wie z. B. dem Östrogen- (ER), Androgen- (AR) und Progesteron- (PR) oder dem Glucocorticoidrezeptor (GR). Die vierte (NR4), fünfte (NR5) und sechste (NR6) Untergruppe wird von unterschiedlichen Vertretern, zumeist so genannter „Waisen-“ („*orphan*“) Rezeptoren gebildet. Diese werden Waisen-Rezeptoren genannt, da für diese Vertreter zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung noch keine natürlichen Liganden bekannt waren und teils bis heute unbekannt sind. Allerdings finden sich auch in den anderen Klassen noch „*orphan*“ Vertreter. Waisen-Rezeptoren, für die mittlerweile spezifische Liganden identifiziert werden konnten, bezeichnet man unterdies als so genannte „*adopted orphan receptors*“ (Aranda and Pascual, 2001; Laudet, 1997).

Klassischerweise gruppiert man die Kernrezeptoren jedoch nach ihren Dimerisierungs- und DNA-Binde-Eigenschaften in vier Hauptgruppen (Mangelsdorf *et al.*, 1995):

Die Steroidhormon Rezeptoren (ER, GR, usw.) gehören demnach zu den Typ I Rezeptoren. Sie binden als Homodimere an kurze, gegenläufige, palindrome DNA-Sequenzmotive (HRE = „*hormone response element*“) im Promoter ihrer Zielgene. Typ II Rezeptoren binden dagegen als Heterodimer mit RXR an „*Response*“-Elemente (RE) mit kurzen Sequenzwiederholungen (DR = „*direct repeat*“). Zu ihnen gehören beispielsweise die Vertreter der RARs und PPARs. Als Homodimere an DR-Sequenzmotive binden vornehmlich die Rezeptoren des Typs III, dazu zählt u. a. HNF4 aber auch RXR. Letzterer nimmt eine Sonderstellung ein, da er mit den Vertretern des Typs II als Heterodimer oder aber allein als Homodimer an entsprechende REs binden kann (Mader *et al.*, 1993; Mangelsdorf *et al.*, 1991). Zur Gruppe des Typs IV gehören dagegen Vertreter, die als Monomere an die DNA binden, wie der „*retinoic acid-related orphan receptor*“ (ROR).

Allen Kernrezeptoren gemein ist ihr struktureller Aufbau, bestehend aus 5 Domänen (A-F siehe Abb. 1.1). Diese setzen sich zusammen aus einer variablen N-terminalen Region (A/B), die teilweise eine Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion-1 beinhaltet. Daran anschließend folgt eine hoch konservierte DNA-Bindedomäne (DBD), bestehend aus zwei Zinkfingermotiven (ca. 70 Aminosäurereste = As) mit je vier Cysteinresten. Eine variable Übergangsdomäne (D), die als eine Art „Scharnier“

fungiert, verbindet die DBD (C) mit der ca. 250 - 300 As umfassenden Ligandenbindungsdomäne (LBD). Die LBD (E) besteht aus 11 - 13 α -Helices, die in einem 3-schichtigen antiparallelen „Sandwich“ angeordnet sind. Im C-terminalen Bereich endet die LBD mit einer Liganden-abhängigen Aktivierungsfunktion-2 (Domäne F), die entscheidend ist sowohl für die Ligandenbindung als auch für die Interaktion mit Co-Faktoren (Carlberg, 2004; Carlberg and Dunlop, 2006; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

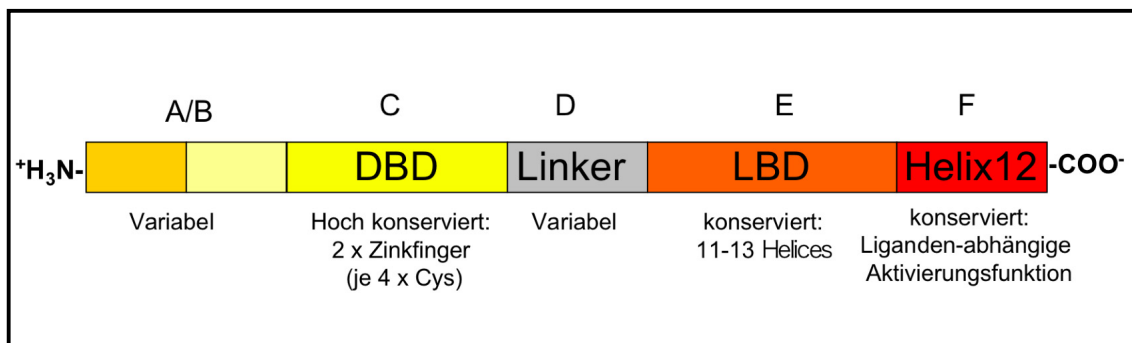


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Grundstruktur von Kernrezeptoren
Erläuterungen siehe Text. (Verändert nach Carlberg, 2004)

1.2 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)

PPARs sind Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren und gehören zur Superfamilie der Kernrezeptoren. Unter diesen bilden sie eine eigene Unterfamilie, bestehend aus drei Rezeptorsubtypen: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2 im weiteren nur noch als PPAR β bezeichnet) und PPAR γ (NR1C3) (NR-Nomenclature, 1999). PPAR α wurde als erstes der drei Mitglieder 1990 entdeckt und gab der Familie ihren Namen, da der Rezeptor durch so genannte Peroxisomen Proliferatoren (PP) aktiviert wird (Isseman and Green, 1990). Kurz darauf wurden die beiden anderen Vertreter β und γ aus *Xenopus* Oozyten isoliert (Dreyer *et al.*, 1992). Da *Xenopus* PPAR β jedoch nur wenig Sequenzhomologie mit dem in der Maus entdeckten Vertreter zeigte, benannte man diesen zunächst als δ in der Überlegung, es gäbe eventuell vier Vertreter dieser Familie (Kliwer *et al.*, 1994). Ratten PPAR β wurde zudem zunächst als FAAR („*fatty acid-activated receptor*“) und humanes als NUC1 („*nuclear hormone receptor 1*“) bezeichnet (Amri *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1992). Durch die Sequenzierung verschiedener Säugetiergenome und dem Sequenzvergleich u. a. mit dem Huhn konnte

jedoch eindeutig geklärt werden, dass FAAR, NUC1, PPAR β und δ den gleichen orthologen Rezeptorsubtyp bezeichnen und Säugetiere insgesamt nur drei PPAR Familienmitglieder besitzen (Michalik *et al.*, 2006).

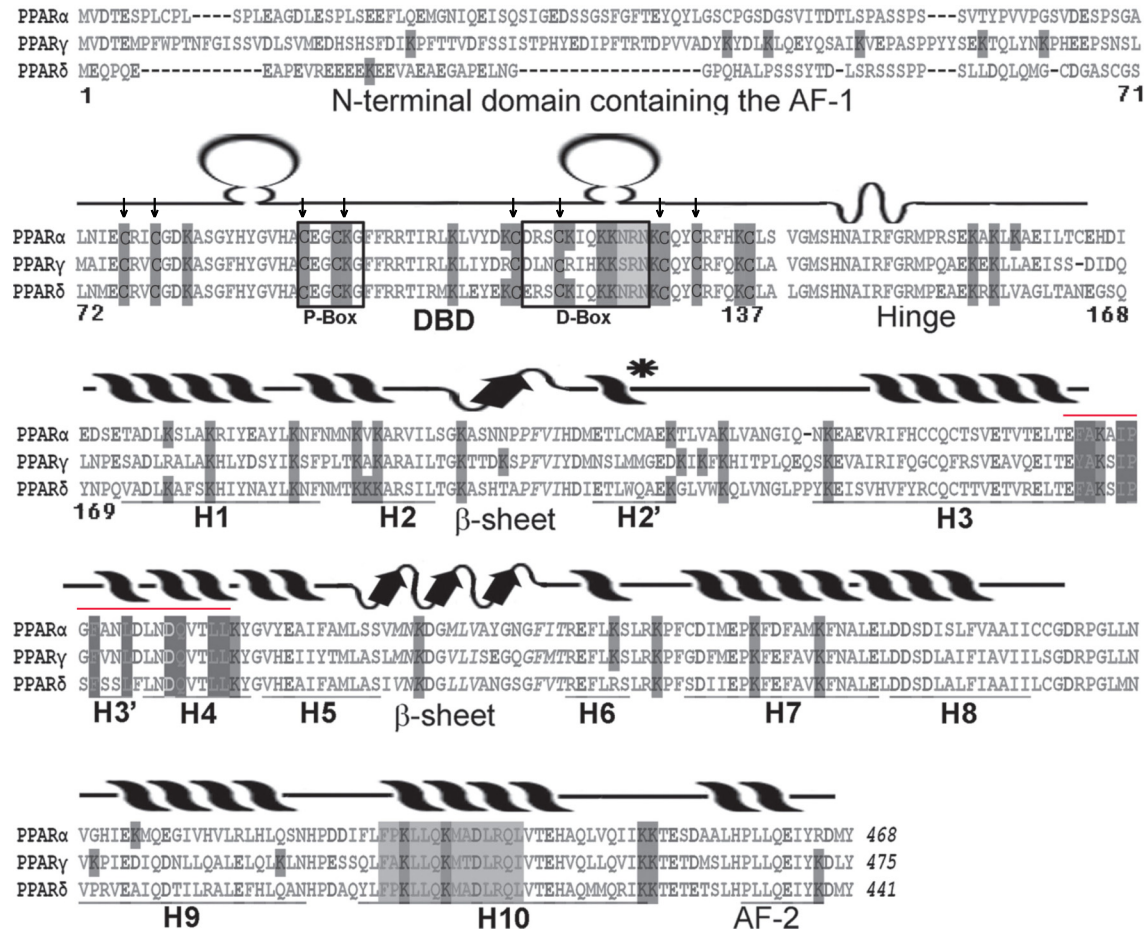


Abb. 1.2: Proteinsequenz sowie grundsätzliche strukturelle Elemente der drei humanen PPAR Subtypen. Schematische Darstellung. Die drei humanen PPAR Subtypen α , β/δ und γ (hier γ 1) zeigen eine hohe Sequenzhomologie von über 60 % (bezogen auf die Gesamtsequenz). In den dargestellten Proteinsequenzen sind alle Lysinreste (K) grau hervorgehoben. Sekundärstrukturen wie α -Helices (H), β -Faltblätter (β -sheets) sowie die für die DNA-Bindung benötigten Zinkfinger motive sind schematisch über der Aminosäuresequenz dargestellt. Die N-terminale Region beinhaltet die Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion 1 (As 1 - 71 für PPAR β/δ). Sie ist die variabelste Region mit nur 15 - 30 % Sequenzhomologie zwischen den drei Rezeptorsubtypen. Die DNA-Bindedomäne (DBD: As 72 - 137 für PPAR β/δ) ist hoch konserviert zwischen allen Kernrezeptoren. 8 Cysteinreste (\downarrow) bilden zwei Zinkfinger motive. Die P-Box ist verantwortlich für die spezifische Bindung an „Response“ Elemente, während die D-Box für die Dimerisierung benötigt wird. Das Kernlokalisationssignal der PPARs (KKNRNKC für PPAR β/δ) befindet sich ebenfalls in der D-Box. Die „Hingeregion“ ist ca. 30 As lang (As 137 - 168; PPAR β/δ) und verbindet DBD mit LBD. Sie dient als eine Art Scharnier und erlaubt eine Konformationsänderung des Rezeptors nach Ligandenbindung. Die Liganden-Bindedomäne (LBD: As 169 - 441; PPAR β/δ) besteht aus 13 konservierten α -Helices (H) sowie 4 β -Faltblättern (zwischen H2 und H2' sowie zwischen H5 und H6). Das Auftreten einer zusätzlichen α -Helix H2' (* zwischen H2 und H3) ist eine Besonderheit der PPARs. Zwei weitere konservierte Regionen finden sich in der LBD: das Kernrezeptor „Signatur“ Motiv (—) sowie C-terminal die Liganden-abhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2). Weiterhin hervorgehoben ist der Bereich der RXR Interaktion in Helix 10 (grau). (Verändert nach Genini and Catapano, 2006)

1.2.1 Struktur

Als Mitglied der Kernrezeptorfamilie teilen die PPARs deren strukturellen Aufbau (vgl. Abb. 1.1). In der variablen N-terminalen A/B Region findet man eine Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1), gefolgt von der hochkonservierten DNA-Bindedomäne. Die LBD der PPARs unterscheidet sich jedoch deutlich in der Größe und dem Vorkommen einer zusätzlichen Helix (H2') zwischen den Helices H2 und H3 von den anderen Kernrezeptoren (siehe Abb. 1.2) (Nolte *et al.*, 1998; Uppenberg *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001). Die große Ligandenbindungsdomäne stellt eine Erklärungsmöglichkeit für das breite Spektrum an unterschiedlichen Liganden der PPARs dar. Unterschiede in der Aminosäuresequenz der LBDs der einzelnen Subtypen sind zudem verantwortlich für das unterschiedliche Bindungsverhalten der verschiedenen Liganden (Hsu *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu klassischen Liganden-induzierten Transkriptionsfaktoren wie den Steroidhormonrezeptoren (ER, GR usw.) zeigen PPARs, vor allem PPAR α , eine konstitutive Basalaktivität (Gurnell *et al.*, 2000; Juge-Aubry *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 1997; Lazennec *et al.*, 2000). Diese erklärt sich aus einer intra- und intermolekularen Stabilisierung der Helix 12 (= AF-2 in Abb. 1.2) in einer aktiven Konformation und die Rekrutierung von Co-Aktivatoren auch in Abwesenheit eines Liganden (Michalik *et al.*, 2007; Molnar *et al.*, 2005). Durch Ligandenbindung kommt es zu einer zusätzlichen Stabilisierung dieser Konformation und damit zu einer Verstärkung der Transaktivierung (siehe Kapitel 1.2.4.2) (Johnson *et al.*, 2000).

1.2.2 Isoformen

Jeder der drei Rezeptorsubtypen wird durch ein eigenes Gen kodiert. Durch alternatives Spleißen und die Benutzung verschiedener Promotoren kommt es zudem sowohl in der Maus als auch im Menschen zu mehreren unterschiedlichen mRNA Transkripten (Chen *et al.*, 1993; Elbrecht *et al.*, 1996; Gearing *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 2002; Sher *et al.*, 1993; Skogsberg *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 1993). Proteinvarianten findet man indes für das humane PPAR α , β und γ sowie für das murine PPAR γ Protein.

Neben dem „volle Länge“ hPPAR α_{wt} Protein (468 As) konnte in unterschiedlichen Geweben auch eine C-terminal deutlich verkürzte, dominant negative Form (hPPAR α_{tr} = 174 As) nachgewiesen werden (Gervois *et al.*, 1999; van Bilsen *et al.*,

2002). Ebenfalls C-terminal um 80 As verkürzt ist das hPPAR β 2. Auch für diese Variante wurde ein dominant negativer Effekt gegenüber hPPAR β 1 (441 As) beschrieben (Lundell *et al.*, 2007; Skogsberg *et al.*, 2000). Für PPAR γ wurden sowohl im Menschen als auch in der Maus zwei Spleißvarianten beschrieben: PPAR γ 1 ist im N-terminalen Bereich 30 As kürzer als das PPAR γ 2 Protein (505 As) (Elbrecht *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1993). Zudem konnte in verschiedenen humanen Tumoren und Tumorzelllinien die Existenz einer C-terminal verkürzten, dominant-negativen Variante (γ ORF4 = 294 As) nachgewiesen werden (Sabatino *et al.*, 2005).

1.2.3 Expressionsprofil

Die drei PPAR Subtypen zeigen ein breites, individuelles, Gewebe- und Zelltyp-spezifisches Expressionsverhalten (Braissant *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1994). PPAR α wird besonders stark in Geweben mit hohem Fettsäurekatabolismus wie der Leber, dem Herzen, der Skelettmuskulatur, dem braunen Fettgewebe, der Niere aber auch dem Darm exprimiert (Escher and Wahli, 2000; Mandard *et al.*, 2004a). PPAR β ist dagegen ubiquitär exprimiert, auf sein detailliertes Expressionsprofil wird im Rahmen seiner biologischen Funktionen (siehe Kapitel 1.2.8) ausführlicher eingegangen. Die beiden PPAR γ Isoformen findet man in weißem und braunem Fettgewebe (Chawla *et al.*, 1994; Dreyer *et al.*, 1992), wohingegen nur PPAR γ 1 auch in anderen Geweben wie dem Darm, dem Gehirn, der Retina, in Endothelzellen und in Zellen des Immunsystems (z. B. Makrophagen) zu finden ist (Tontonoz *et al.*, 1994a; Zhu *et al.*, 1995).

1.2.4 Regulation der Transkription

1.2.4.1 Heterodimerisierung und DNA-Bindung

PPARs regulieren die Expression ihrer Zielgene nach Heterodimerisierung mit ihrem obligatorischen Partner RXR (PPAR:RXR) und Bindung an spezifische PPAR „Response“ Elemente (PPREs) (Gearing *et al.*, 1993; Keller *et al.*, 1993). Alle drei RXR Subtypen (α ; β ; γ) sind dabei in der Lage, funktionelle Dimere mit den einzelnen PPARs zu bilden, wobei spezifische Interaktionen Einfluss auf die Bindung an

Zielpromotoren zu haben scheinen (Juge-Aubry *et al.*, 1997). Die Interaktion der Dimerisierungspartner erfolgt über die so genannte D-Box im Bereich der DBD sowie mit spezifischen Aminosäuren im Bereich der Helix 10 der PPAR-LBD (siehe Abb. 1.2) (Dowell *et al.*, 1997b; Juge-Aubry *et al.*, 1995). Die Bildung der Heterodimere ist dabei unabhängig von einer DNA- oder Ligandenbindung (Feige *et al.*, 2005). PPRES finden sich zumeist in mehreren Kopien sowohl im Promotor als auch in Intronsequenzen der entsprechenden Zielgene (Di-Poi *et al.*, 2002; Mandard *et al.*, 2004b). Sie bestehen aus einer direkten Wiederholung der Konsensus-Sequenz AGGTCA, welche durch ein Nukleotid getrennt wird (DR-1; „*direct-repeat*“ siehe Abb. 1.3) (Kliwer *et al.*, 1992). PPAR:RXR-Dimere binden immer in derselben Orientierung an ein PPRE (5'-PPAR:RXR-3'). Die Spezifität für einen speziellen PPAR-Subtyp hängt dabei vom 5'-flankierenden Bereich ab. Zudem kommt es zu einer verstärkten Bindung, wenn es sich bei dem Nukleotid zwischen den beiden Halbseiten um ein Adenin handelt (DiRenzo *et al.*, 1997; IJpenberg *et al.*, 1997; Juge-Aubry *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1995). Bei den PPAR:RXR-Dimeren handelt es sich um permissive² Komplexe, d. h. sie können sowohl durch PPAR als auch durch RXR Liganden aktiviert werden (Gearing *et al.*, 1993; Keller *et al.*, 1993). Bindung beider Liganden führt zudem zu einem synergistischen Effekt auf die Transaktivierung (Isseman *et al.*, 1993; Kliwer *et al.*, 1992).

1.2.4.2 Co-Faktoren

Die transkriptionelle Regulation von PPAR-Zielgenen erfolgt durch Bindung des PPAR:RXR Heterodimers an ein PPRE sowie dessen Liganden-abhängige Interaktion mit Co-Faktoren (Michalik *et al.*, 2006). Co-Faktoren sind Proteinkomplexe, die transkriptionelle Aktivität von Kernrezeptoren entweder reprimieren (Co-Repressoren) oder durch Auflockerung der Chromatinstruktur und Stabilisierung der basalen Transkriptionsmaschinerie verstärken können (Co-Aktivatoren) (Aranda and Pascual, 2001).

² Bei nicht permissiven Dimeren wie z. B. RXR:RAR-, RXR:TR- oder RXR:VDR-Dimeren, kann RXR nur dann seinen Liganden binden, wenn zuvor der Ligand des entsprechenden Heterodimerisierungspartners gebunden hat (Aranda and Pascual, 2001).

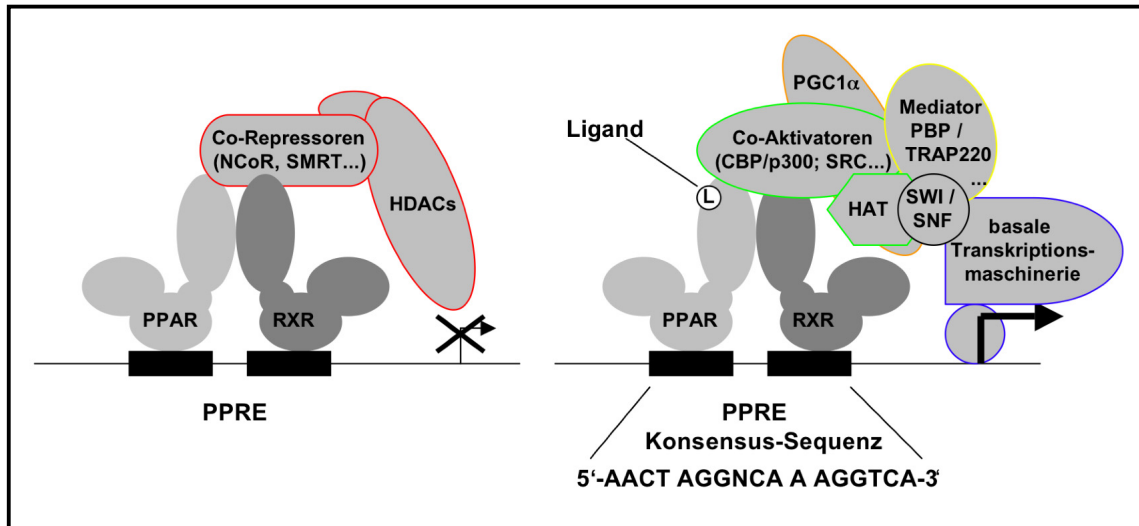


Abb. 1.3: Liganden-abhängige Transkriptionsregulation durch PPAR:RXR Heterodimere. Schematische Darstellung. PPAR:RXR Heterodimere binden an spezifische PPAR „Response“ Elemente (PPRE) im Promotor- bzw. im Intronbereich ihrer Zielgene. In Abwesenheit eines spezifischen Liganden kommt es zur Interaktion mit Co-Repressoren und zur Repression der entsprechenden Zielgene (links). Durch spezifische Ligandenbindung (rechts) werden dagegen Co-Aktivatoren rekrutiert, die aufgrund ihrer Histon-Acetylase Aktivität (HAT) das Chromatin auflockern und so die Bindung der basalen Transkriptionsmaschinerie ermöglichen. Details siehe Text. (Verändert nach Feige *et al.*, 2006)

Klassische Co-Repressoren wie NCoR („*nuclear receptor corepressor*“), SMRT („*silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*“) oder SHARP („*SMRT and histone deacetylase-associated repressor protein*“) reprimieren die Transaktivierung von PPAR:RXR-Dimeren in der Abwesenheit von Liganden durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDACs) (Krogdham *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Stanley *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2005). Ligandenbindung führt indes zu einer Konformationsänderung in der LBD (Wurtz *et al.*, 1996) und zur Bindung von Co-Aktivatoren über ein konserviertes LXXLL Motiv, auch „*Nuclear Box*“ genannt (wobei L für Leucin und X für jede andere Aminosäure steht) (Heery *et al.*, 1997; Nolte *et al.*, 1998). Die Liganden-abhängige Bindung eines Co-Aktivatoren führt dagegen zu einem Umbau und einer Auflockerung der Chromatinstruktur. Diese wird vermittelt durch die intrinsische Histon-Acetylase-Aktivität (HAT) verschiedener Co-Aktivatoren sowie die Rekrutierung von DNA-„*Remodeling*“ Komplexen (SWI/SNF: „*switch/sucrose non-fermenting complex*“) (Lemon *et al.*, 2001; Martens and Winston, 2003). PPAR-abhängige Interaktionen von Co-Aktivatoren mit HAT-Aktivität konnten für die CRBP-bindenden Proteine CBP und p300 gezeigt werden (Dowell *et al.*, 1997a; Gelman *et al.*, 1999) sowie für eine weitere Gruppe PPAR-bindender Co-Aktivatoren aus der p160 Familie. Zu ihnen gehören z. B. die SRCs 1 - 3 (Steroid Rezeptor Co-Aktivator). Neben

einer direkten Interaktion mit den PPARs (Gelman *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2004; Molnar *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2002) wird aber auch ein lediglich indirekter Effekt auf die PPAR-abhängige Transaktivierung durch eine direkte Interaktion dieser Co-Aktivatoren mit RXR diskutiert (Feige *et al.*, 2006; Ijpenberg *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2000). Ein weiterer wichtiger Co-Faktor ist der PPAR γ Co-Aktivator 1 α (PGC1 α). Dieser fungiert als eine Art molekulares Gerüst bei der Assemblierung von Aktivierungskomplexen (Puigserver *et al.*, 1999). Das PPAR γ -bindende Protein (PBP) bildet als Teil des Mediator-Komplexes (TRAP220) hingegen eine Brücke zwischen den PPARs und der basalen Transkriptionsmaschinerie (Lewis and Reinberg, 2003; Zhu *et al.*, 1997).

1.2.5 Liganden

In der Zelle dienen PPARs als Lipidsensoren, die nahrungsbedingte Veränderungen im Lipid- und Fettsäurehaushalt in metabolische Aktivität umsetzen (Bishop-Bailey and Wray, 2003; Evans *et al.*, 2004). PPARs werden natürlicherweise durch ein breites Spektrum an ungesättigten Fettsäuren und deren Derivate aktiviert, zu ihnen zählen u. a. die Arachidonsäure (AA) sowie deren metabolische Stoffwechselprodukte wie die Eicosanoide. Viele dieser Fettsäuren zeigen jedoch nur niedrige Affinitäten, so dass unklar ist, ob physiologisch überhaupt ausreichend hohe Konzentrationen für eine PPAR Aktivierung erreicht werden können (Desvergne and Wahli, 1999; Keller *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1999). Neben den endogenen Liganden gibt es auch eine Reihe von exogenen, synthetischen Liganden. Dazu zählen beispielsweise Xenobiotika wie Weichmacher und Herbizide, aber auch Medikamente wie z. B. Fibrate, NSAIDs („*non steroidal anti inflammatory drugs*“) und Thiazolidindione (Escher and Wahli, 2000; Komar, 2005). Während die meisten Fettsäuren in der Lage sind, alle drei PPAR-Subtypen zu aktivieren, konnte für verschiedene natürliche und zahlreiche synthetische Liganden eine deutliche Subtyp-Spezifität nachgewiesen werden.

So wird PPAR α von den drei Subtypen am stärksten durch langkettige, ungesättigte Fettsäuren wie AA, Linolsäure, Ölsäure, Palmitinsäure, Pristan- und Phytansäure aktiviert (Hihi *et al.*, 2002; Zomer *et al.*, 2000). Zudem sind Derivate aus dem Lipoxygenase-Metabolismus wie Leukotrien B₄ (LTB₄) oder dem Cytochrom P450 Metabolismus wie 8(S)-HETE (8-S-Hydroxyeicosatetraensäure) PPAR α spezifische

Aktivatoren (Devchand *et al.*, 1996; Krey *et al.*, 1997). Zu den hoch affinen synthetischen PPAR α Agonisten zählen u. a. die Wirkstoffgruppe der Fibrate (z. B. Bezafibrat = Cedur[®]), die in der Klinik zur Behandlung überhöhter Blutfettwerte (Hyperlipidämie) eingesetzt werden (Forman *et al.*, 1997; Issemann *et al.*, 1993). Auch für Vertreter aus anderen klinischen Wirkstoffgruppen, wie die der NSAIDs (z. B. Ibuprofen), konnte eine Aktivierung von PPAR α nachgewiesen werden. Allerdings können diese, ähnlich wie die Fibrate, in höheren Konzentrationen auch PPAR γ aktivieren (Kliwer *et al.*, 1997; Lehmann *et al.*, 1997).

PPAR β wird, ähnlich wie PPAR α , durch ungesättigte Fettsäuren wie AA, Eicosapentaensäure (EPA) oder Linolsäure aktiviert, aber auch Prostanoiden aus dem Cyclooxygenase-Metabolismus wie Prostaglandin A_{1/2} (PG A_{1/2}), D_{1/2} (PGD_{1/2}) und 15-deoxy Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) führen zu einer schwachen Stimulation des Rezeptors (Forman *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1995). Aufgrund der hohen Affinität des synthetischen Prostacyclinanalogons Carbaprostacyclin (cPGI) wird das endogene Prostacyclin (PGI₂) in der Literatur häufig als hochaffiner PPAR β Ligand diskutiert (Gupta *et al.*, 2000; Hatae *et al.*, 2001; Lim and Dey, 2000; Lim *et al.*, 1999). Allerdings konnten Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen dies nicht bestätigen (Fauti *et al.*, 2006; Forman *et al.*, 1997; Forman *et al.*, 1995). Als weiterer potentieller, natürlicher Ligand wurde der Vitamin A Metabolit und RAR Ligand *all-trans* Retinsäure (*atRA*) beschrieben (Schug *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2003). Der Nachweis eines hochaffinen und stark aktivierenden physiologischen PPAR β Liganden konnte indes bisher aber noch nicht erbracht werden. Dagegen gibt es neben cPGI weitere synthetische, hochaffine PPAR β -spezifische Liganden. Zu ihnen zählt beispielsweise L165,041 und GW0702, aber auch GW501516, eine Substanz, die zur Zeit in einer klinischen Phase II Studie zur Behandlung von Dyslipidämie getestet wird (GlaxoSmithKline, Studiennummer: NCT00158899; Pelton, 2006).

PPAR γ wird ebenfalls nur gering durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren stimuliert (Desvergne and Wahli, 1999). Zu einer verstärkten Aktivierung führen hingegen die oxidierten Linolsäuremetaboliten 9-HODE und 13-HODE (9-bzw. 13-Hydroxyoctadecadiensäure), der Arachidonsäure-Metabolit 15-HETE (15-Hydroxyeicosatetraensäure) sowie oxLDL (oxidiertes „low density lipoprotein“) (Nagy *et al.*, 1998). Zudem wurde das Prostaglandinderivat 15-deoxy- $\Delta^{2,14}$ -Prostaglandin J₂ (PGJ₂) als spezifischer endogener Ligand für PPAR γ identifiziert

(Forman *et al.*, 1995; Kliwer *et al.*, 1995). Als synthetische Liganden fungieren indes Vertreter der Thiazolidindione (z. B. Rosiglitazon = Avandia[®]), eine Wirkstoffgruppe, die als so genannte Insulin-Sensitizer zur Behandlung von Typ II Diabetes eingesetzt wird (Lehmann *et al.*, 1995).

1.2.5.1 Liganden-bindende Proteine

Das hydrophile Milieu der Zelle stellt ein Problem auf dem Weg lipophiler Liganden zu ihrem entsprechenden Rezeptor dar. Intrazelluläre Transportproteine wie CRABPs („*cellular retinoic acid binding protein*“), CRBPs („*cellular retinol binding protein*“) und FABPs („*fatty acid binding protein*“) binden daher Fett- bzw. Retinsäuren und deren Derivate und transportieren diese vom Cytoplasma in den Zellkern. Die Vertreter der iLBP (intrazelluläre Lipid-bindende Proteine) gewährleisten dabei den Schutz und den Transport durch das wässrige Milieu des Cytoplasmas und garantieren dadurch die Verfügbarkeit der lipophilen Liganden im Kern (Coe and Bernlohr, 1998; Storch and Thumser, 2000). In den vergangenen Jahren wurde zudem in mehreren Studien gezeigt, dass die verschiedenen Mitglieder der FABPs bestimmte PPAR Liganden binden und diese direkt an ihren spezifischen Rezeptor-Subtyp durch so genanntes „*channeling*“ übergeben können. Durch diesen Mechanismus wird die Verfügbarkeit entsprechender Liganden für den Rezeptor erhöht und trägt damit zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität bei (Noy, 2000; Tan *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2001). Demnach werden PPAR α Liganden je nach Zelltyp von H-FABP („*heart*“-FABP/FABP3) bzw. L-FABP („*liver*“-FABP/FABP1) und PPAR γ Liganden durch A-FABP („*adipose*“-FABP/FABP4) in den Kern transportiert und erhöhen dadurch die Transaktivierung des Rezeptors (Adida and Spener, 2006; Helledie *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2001). PPAR β Liganden interagieren dagegen vornehmlich mit K-FABP („*keratinocyte*“-FABP/„*epidermal*“-FABP = E-FABP/FABP5) (Schug *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2002). Schug und Kollegen beschrieben zudem kürzlich einen Mechanismus, unter welchem die ursprünglich als Ligand für die Retinsäurerezeptoren (RARs) beschriebene *all-trans* Retinsäure (Giguere *et al.*, 1987) auch als direkter Ligand für PPAR β fungieren kann. Entscheidend dabei ist das Verhältnis von FABP5 zu CRABP2, ein Retinsäure-bindendes Protein, welches *atRA* zu den RA-Rezeptoren transportiert und dort direkt übergibt (Budhu and Noy, 2002; Dong *et al.*, 1999; Manor

et al., 2003; Tan *et al.*, 2002; Yasmin *et al.*, 2004). Ist das Verhältnis von FABP5 zu CRABP2 ($\text{FABP5} > \text{CRABP2}$) hoch, bindet demnach *atRA* an FABP5 und aktiviert PPAR β , wohingegen es im umgekehrten Fall ($\text{CRABP2} > \text{FABP5}$) zur Aktivierung der RARs kommt (Schug *et al.*, 2007).

1.2.6 Posttranslationale Modifikationen

Neben der Liganden-abhängigen Aktivierung wird die transkriptionelle Aktivität der PPARs auch durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung und Nitrierung beeinflusst.

Sowohl PPAR α als auch PPAR γ sind Phosphoproteine. Die Auswirkungen der Phosphorylierung auf die transkriptionelle Aktivität der beiden Rezeptoren sind dabei abhängig von der Kinase und der Aminosäure an der die Modifikation erfolgt (Gelman *et al.*, 2005). So führt z. B. die Insulin-abhängige Phosphorylierung von PPAR α AF-1 durch die MAP-Kinase („*mitogen-activated protein kinase*“) zu einer erhöhten Aktivität des Rezeptors (Juge-Aubry *et al.*, 1999). Die Modifikation durch die Calcium-abhängige Protein Kinase (PKC) in der „Hingeregion“ führt dagegen zu einer reduzierten Heterodimerisierung mit RXR (Gray *et al.*, 2005) und die Phosphorylierung der DBD durch die cAMP-abhängige Protein Kinase (PKA) zu einer Beeinflussung der Bindeeigenschaften an PPRES sowie zu einer Verstärkung der Transaktivierung (Lazennec *et al.*, 2000). Die Phosphorylierungen von PPAR γ durch die ERK- („*extracellular signal-regulated kinases*“), JUN- („*c-jun n-terminal kinase*“) oder AMP-Kinase („*AMP-activated protein kinase*“) führen indes zu einer verringerten Transaktivierung des Rezeptors (Adams *et al.*, 1997; Leff, 2003). PPAR β wurde im Hinblick auf eine mögliche Phosphorylierung bisher nur wenig analysiert, allerdings führt die Behandlung mit cAMP- und PKA-Aktivatoren zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität (Hansen *et al.*, 2001; Krogsdam *et al.*, 2002; Lazennec *et al.*, 2000).

Die Modifikation durch Ubiquitin wurde für alle drei Rezeptoren beschrieben. Demnach führt die Ubiquitinierung bei PPAR α zu einer schnellen Degradation des Rezeptors. Durch Bindung eines spezifischen Liganden kommt es dagegen zur Stabilisierung des Proteins, was sich in einer verminderten Ubiquitinierung und einer verlängerten Halbwertszeit äußert (Blanquart *et al.*, 2002). Ähnliches wurde kürzlich für PPAR β

beschrieben (Genini and Catapano, 2007). Bei PPAR γ führt die Ligandenbindung dagegen zu einer verstärkten Modifikation durch Ubiquitin und damit zu einer schnelleren Degradation des Proteins (Hauser *et al.*, 2000).

Die SUMOylierung erfolgt vergleichbar der Ubiquitinierung durch Modifikation spezieller Lysinreste und wurde bisher nur für PPAR γ beschrieben. SUMOylierung von K77 im murinen PPAR γ 1 führt demnach zu einer Inhibition der Liganden-abhängigen Induktion von Zielgenen (Ohshima *et al.*, 2004), während die Liganden-abhängige SUMOylierung von K365 zu einer Interaktion von PPAR γ 1 mit einem spezifischen Repressorkomplex im Promotor bestimmter NF- κ B Zielgene führt. Diese verhindert die Ubiquitinierung und damit den Abbau des Komplexes und wandelt PPAR γ damit von einem Transkriptionsaktivator in einen Promotor-spezifischen Repressor (Pascual *et al.*, 2005).

Die Nitrierung von Tyrosinresten wurde bisher ebenfalls nur für PPAR γ beschrieben und führt aufgrund einer verminderten Kerntranslokation des Rezeptors zu einer reduzierten Expression von PPAR γ Zielgenen (Shibuya *et al.*, 2002).

1.2.7 Biologische Funktionen

Durch Analyse von Knockout-Tiermodellen sowie die Behandlung mit spezifischen Agonisten und Antagonisten konnten seit ihrer Entdeckung Anfang der neunziger Jahre zahlreiche physiologische und pathophysiologische Funktionen der PPARs aufgedeckt werden. Trotz des enormen Fortschritts im Verständnis ihrer Funktionen wird ihre Rolle in diversen Prozessen, wie z. B. der Tumorigenese oder Arteriosklerose, teils kontrovers diskutiert. Die nachfolgenden Kapitel sollen daher einen kurzen Überblick über die biologischen und pathophysiologischen Funktionen von PPAR α und γ geben, bevor dann in Kapitel 1.2.8 ausführlich auf den Subtyp PPAR β eingegangen wird.

1.2.7.1 PPAR α

PPAR α wurde damals als erster der drei Subtypen als Rezeptor für Peroxisomen Proliferatoren (PP) in murinen Hepatozyten entdeckt (Issemann and Green, 1990). Diese führen bei Nagern zu Leberkarzinomen (Lee *et al.*, 1995), ein Spezies-spezifischer Effekt, der im Menschen bisher nicht beobachtet werden konnte (Boitier *et*

al., 2003; Cheung *et al.*, 2004). Die Analyse von PPAR α Knockout-Mäusen konnte zudem den Einfluss des Rezeptors auf die mitochondriale und peroxisomale β -Oxidation von Fettsäuren (FA), deren Aufnahme und Transport sowie den Einfluss auf die Lipoprotein-Assemblierung, besonders unter den Bedingungen der Nahrungskarenz („*fasting*“) zeigen (Aoyama *et al.*, 1998; Djouadi *et al.*, 1998; Kersten *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte die Induktion entsprechender Zielgene wie die Lipoproteinlipase (LPL), die Fettsäuretransporter „*fatty acid transport protein*“ (FATP), „*fatty acid translocase*“ (FAT/CD36) und „*liver fatty acid binding protein*“ (L-FABP/FABP1), die Carnitin-Palmitoyltransferase I (CPT1), von katabolisierenden Enzymen der β -Oxidation (z. B. acyl-CoA Oxidase) sowie der mikrosomalen ω -Oxidation (CYP4A) nach Aktivierung des Rezeptors nachgewiesen werden (Brandt *et al.*, 1998; Issemann *et al.*, 1992; Motojima *et al.*, 1998; Muerhoff *et al.*, 1992; Schoonjans *et al.*, 1996, Tugwood *et al.*, 1992). Ferner spielt PPAR α eine Rolle beim Aminosäuremetabolismus sowie der Ketogenese und Glukoneogenese in der Leber (Mandard *et al.*, 2004a). Damit nimmt der Rezeptor eine zentrale Rolle bei der Regulation des Fettsäurekatabolismus und der Steuerung der Energiehomöostase ein. Pharmakologische PPAR α Aktivatoren wie die Fibrate werden demzufolge auch zur Behandlung von Hyperlipidämien eingesetzt (Forman *et al.*, 1997; Staels and Fruchart, 2005). Zudem zeigen diese einen protektiven Effekt vor Arteriosklerose durch die Senkung des VLDL-Cholesterols („*very low density lipoprotein*“) und der Induktion des HDL-bindenden („*high density lipoprotein*“) Apolipoprotein A-1 (Apo A-1) sowie die Induktion der Cholesterol-Efflux-Pumpe (ABCA-1; „*ATP-binding cassette A1*“) in Makrophagen. Apo A-1 und ABCA1 sind dabei wichtige Bestandteile des reversen Cholesteroltransports von der Peripherie in die Leber (Chinetti *et al.*, 2001; Vu-Dac *et al.*, 1998).

Neben diesen Stoffwechsel-regulatorischen Funktionen wurden auch Auswirkungen auf Entzündungsreaktionen durch Repression entzündungsfördernder Gene beschrieben. So sinken nach PPAR α Aktivierung die Plasmakonzentrationen der pro-atherogenen Proteine Fibrinogen und C-reaktives Protein (CRP) (Kockx *et al.*, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fibrate in „*vascular smooth muscle cells*“ (VSMC) zu reduzierten Plasmakonzentrationen der Entzündungsmediatoren Interleukin 6 (IL-6) und Cyclooxygenase 2 (Cox-2) durch Repression des „*nuclear factor κ B*“ (NF κ B) Signalwegs beitragen (Staels *et al.*, 1998). Zudem induziert PPAR α die Expression des

NFκB-Inhibitors IκBα (Delerive *et al.*, 2002; Delerive *et al.*, 2000).

Neben seiner Rolle bei der Entstehung von Leberkarzinomen in Nagern führt die Aktivierung des Rezeptors in der Epidermis zur Differenzierung, zeigt anti-proliferative Effekte und reguliert die Apoptose von Keratinozyten (Komuves *et al.*, 2000a; Komuves *et al.*, 2000b). Zudem konnten protektive Effekte von PPARα Agonisten bei der Entstehung von Hautkrebs nachgewiesen werden (Thuillier *et al.*, 2000). Im Menschen hemmen diese die Proliferation von Melanozyten und stimulieren deren Differenzierung (Kang *et al.*, 2004). Eine Studie von Maggiora und Kollegen konnte zudem zeigen, dass die Stimulation verschiedener humaner Zell- und Tumorzelllinien mit Linolsäurekonjugaten zu einer starken Induktion des Apoptoseprogramms führt, welches mit einer deutlichen Zunahme der PPARα-Expression korreliert (Maggiora *et al.*, 2004). Abgesehen von der Spezies-bedingten Induktion von Leberkarzinomen scheint PPARα damit Tumor-protektive Wirkungen zu besitzen, welche den Rezeptor zu einem interessanten pharmakologischen Ziel zur Chemoprävention von Hautkrebs machen (Sertznig *et al.*, 2007).

1.2.7.2 PPARγ

PPARγ ist an zahlreichen physiologischen Prozessen wie der Regulation von Glukose- und Lipidhomöostase, der Energiebalance sowie der Steuerung von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt (Rosen and Spiegelman, 2001; Rosen *et al.*, 2000; Spiegelman, 1998; Spiegelman and Flier, 2001). Zudem sind homozygote PPARγ Knockout-Mäuse embryonal lethal, Ursache dafür sind Störungen in der Kardial- und Plazentaentwicklung (Barak *et al.*, 1999).

Entsprechend seines Expressionsprofils ist PPARγ ein wichtiger Regulator im Prozess der Fettspeicherung. Des Weiteren ist er zusammen mit C/EBPα („*CCAAT-enhancer binding protein*“) in die Differenzierung von Adipozyten involviert (Shao and Lazar, 1997; Wu *et al.*, 1999). So reicht seine Überexpression in Fibroblasten zur Einleitung der Adipogenese (Rosen *et al.*, 2000). Zu den von PPARγ regulierten Genen gehören u. a. das *Fettsäure-bindende Protein 4 (FABP4/A-FABP/aP2)*, der *Glukosetransporter 4 (Glut4)*, die „*uncoupling proteins*“ 2 und 3 (UCP2 und 3) sowie die ebenfalls durch PPARα regulierten Gene *acyl-CoA Synthase*, *LPL*, *CD36/FAT* und *FATP* (Aubert *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Schoonjans *et al.*, 1996; Sfeir *et al.*, 1997; Tontonoz *et al.*,

1994a; Young *et al.*, 1995). Weiterhin führt die Aktivierung von PPAR γ zu einer erhöhten Glukoseaufnahme aus dem Blut, die zusammen mit der Senkung der Blutfette und einem erhöhten Energieverbrauch in Leber und Fettgewebe zur anti-diabetischen Wirkung des Rezeptors beiträgt (Lee *et al.*, 2003b). Zudem kommt es zur verminderten Expression der Adipokine Leptin und Resistin (De Vos *et al.*, 1996; Shojima *et al.*, 2002) sowie von TNF α („*tumor necrosis factor α* “), einem insulinresistenz- und entzündungsfördernden Cytokin (Miles *et al.*, 1997; Peraldi *et al.*, 1997).

Neben der Behandlung von Typ II Diabetes werden pharmakologische PPAR γ Aktivatoren, wie die Thiazolidindione, auch zur Behandlung von Entzündungskrankheiten und Arteriosklerose eingesetzt. Die anti-entzündlichen Eigenschaften sind dabei auf die PPAR γ -abhängige Regulierung von Cytokinen (TNF α), Interleukinen (IL-1 β und IL6), Nitritoxid (NO) und durch Inhibition von entzündungsfördernden Signalwegen wie NF κ B und AP-1 („*activating protein 1*“) in Makrophagen und Monozyten zurückzuführen (Ricote *et al.*, 1999).

Die Rolle des Rezeptors in der Arteriosklerose ist indes kontrovers. So fördert PPAR γ die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen, was zur Bildung von Schaumzellen führt und ein kritisches Ereignis bei der Entstehung von atherogenen *Plugs* darstellt (Tontonoz *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite fördert der Rezeptor, ähnlich wie PPAR α , den reversen Cholesteroltransport durch Regulation von LXR und der damit verbundenen Induktion von ABCA1 und ABCG1 (Chawla *et al.*, 2001; Chinetti *et al.*, 2001). Zudem inhibiert PPAR γ die Akkumulation von Monozyten in der Arterienwand und die Proliferation von VSMC (Pasceri *et al.*, 2000; Wakino *et al.*, 2000). Ferner bewirken die Senkung der Blutfettwerte durch Induktion der LPL und die gesteigerte Aufnahme von FA ins Fettgewebe sowie die anti-entzündlichen Eigenschaften einen protektiven Effekt vor der Entstehung bzw. Progression der Arteriosklerose (Castrillo and Tontonoz, 2004; Li *et al.*, 2000).

Auch in Bezug auf die Rolle bei der Tumorentstehung und -progression gibt es widersprüchliche Studien. So führt die Aktivierung des Rezeptors nicht nur in Adipozyten, sondern auch in einer Vielzahl von weiteren Zelltypen (z. B. Leber- und Kolonzellen, Myozyten und Fibroblasten), Tumoren (u. a. Brust-, Blut-, Magen- und Darmkrebs, Melanomen und Liposarkomen) sowie in zahlreichen Tumorzelllinien zu Zellzyklusarrest, terminaler Differenzierung, Apoptose oder Fibrose (zusammengefasst

in Michalik *et al.*, 2004; Sertznig *et al.*, 2007; Theocharis *et al.*, 2004). Des Weiteren haben Träger einer PPAR γ Haploinsuffizienz ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Brust-, Ovarial- und Hautkrebs (Nicol *et al.*, 2004).

Im Widerspruch dazu stehen Befunde wonach PPAR γ Inhibitoren einen stärkeren Effekt auf das Zellsterben von Leberkarzinomen zeigen als verschiedene Thiazolidindionderivate (Schaefer *et al.*, 2005). Für letztere wurde zudem beschrieben, dass sie zu einer Vermehrung der Polypen in einem Darmkrebs-Maustumormodell beitragen (APC^{Min/+} Mäuse = „*adenomatous polyposis coli protein*“) (Lefebvre *et al.*, 1998; Saez *et al.*, 1998). Ferner führt die Expression einer konstitutiv aktiven PPAR γ Mutante in der Brustdrüse der Maus zur Entwicklung von Tumoren (Saez *et al.*, 2004).

Insgesamt scheinen aber die antitumorigenen Wirkungen von PPAR γ zu überwiegen, wobei weitere Untersuchungen von Nöten sind, um dies endgültig zu klären.

1.2.8 PPAR β

Im Vergleich zu den beiden anderen PPARs ist PPAR β der bislang am wenigsten untersuchte Rezeptorsubtyp. PPAR β ist ubiquitär exprimiert, mit besonders starker Expression im Dünndarm, Keratinozyten, Leber, Dickdarm, Haut, Muskel, Plazenta sowie im Gehirn und ZNS. Zudem zeigt er eine meist stärkere Expression gegenüber den beiden anderen Subtypen (Auboeuf *et al.*, 1997; Braissant *et al.*, 1996; Desvergne and Wahli, 1999; Girroir *et al.*, 2008b; Nadra *et al.*, 2006; Varnat *et al.*, 2006).

1.2.8.1 PPAR β spezifische Regulation der Transkription

Die allgemeine transkriptionelle Regulation von PPAR β Zielgenen erfolgt wie für alle PPAR-Subtypen unter 1.2.4 beschrieben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des Rezeptors mit dem Repressorprotein BCL6 („*B cell lymphoma-6*“) in Makrophagen zur Induktion entzündungsfördernder Gene führt („*sqelching*“ von BCL6). In Abwesenheit des Rezeptors oder durch PPAR β -spezifische Ligandenbindung wird BCL6 dagegen wieder freigesetzt und es kommt zur Repression der entsprechenden Gene (Lee *et al.*, 2003a). Ein weiterer Mechanismus der Trans-Repression durch PPAR β wurde in Herzmuskelzellen beschrieben. Demnach führt die

Ligandenaktivierung zu einer verstärkten Interaktion zwischen dem Rezeptor und der p65 Untereinheit von NF κ B und damit zu einer verminderten Aktivität des NF κ B-Signalwegs (Planavila *et al.*, 2005). Zudem reprimiert PPAR β *in vitro* die Expression von PPAR α und γ Zielgenen durch Bindung an deren PPRE und Co-Repressor-Rekrutierung (Shi *et al.*, 2002).

1.2.8.2 Biologische Funktionen

Das Verständnis für die unterschiedlichen Funktionen von PPAR β konnte in den letzten Jahren u. a. durch Analyse der verschiedenen Knockout-Mäuse (vollständiger Knockout: PPAR $\beta^{-/-}$ und konditionaler Knockout PPAR δ^{ck}) erweitert werden. Das Spektrum der unterschiedlichen Funktionen reicht dabei von der Regulation des Lipid- und Glukosestoffwechsels sowie der Thermogenese über die Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen bis hin zu anti-entzündlichen Funktionen und einer kontrovers diskutierten Rolle bei der Tumorentstehung (Barak *et al.*, 2002; Burdick *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2004; Di-Poi *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2004; Hollingshead *et al.*, 2007b; Lee *et al.*, 2006a; Michalik *et al.*, 2004; Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007; Nadra *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2001; Varnat *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003). In den nachfolgenden Kapiteln soll daher auf die einzelnen Funktionen detaillierter eingegangen werden.

1.2.8.2.1 Lipid- und Glukosemetabolismus

PPAR β Knockout-Mäuse zeigen eine deutliche Reduktion ihrer Körperfettmasse (Barak *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2000), allerdings konnte dieser Phänotyp nicht in einem Adipozyten-spezifischen konditionalen Knockout gezeigt werden (Barak *et al.*, 2002). Entsprechend liegt die Vermutung nahe, dass der Rezeptor weniger in die Adipozytendifferenzierung als vielmehr in eine systemische Regulation des Fettstoffwechsels involviert ist. Unterstützt wird diese Annahme durch Studien, die zeigen konnten, dass die konstitutive Aktivierung des Rezeptors (VP16-PPAR β) im Fettgewebe von Mäusen zu einer Reduzierung der Gesamtfettmasse führt. Zudem waren die Versuchstiere resistent gegen eine ernährungsbedingte bzw. durch Deletion des

Leptinrezeptors (*db/db*) hervorgerufene Adipositas (Wang *et al.*, 2003). Weiterhin führt die Aktivierung im Fettgewebe zur Induktion von Genen der mitochondrialen β -Oxidation wie z. B. *Cpt1 α* („*carnitine palmitoyltransferase 1 α* “) und *Acox* („*acyl-CoA oxidase*“), aber auch von Genen, die in die Regulation der Thermogenese bzw. Energiehomöostase wie die „*uncoupling proteins 1-3*“ (*Ucp1-3*) involviert sind. Einhergehend mit diesen Befunden konnte eine gesteigerte Fettverbrennung sowie eine damit verbundene Reduktion der Blutfett- und Glukosewerte beobachtet werden (Wang *et al.*, 2003). Ähnliche Effekte konnten auch nach Überexpression bzw. nach konstitutiver Aktivierung des Rezeptors im Muskel nachgewiesen werden (Luquet *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004b). Die konstitutive Aktivierung (VP16-PPAR β) in der sogenannten „Marathonmaus“ zeigte zudem einen höheren Anteil an oxidativen Typ I Muskelfasern, verbunden mit einer gesteigerten Fettverbrennungsrate und größerer Ausdauer. So liefen diese Mäuse im Ausdauertest fast doppelt so weit wie ihre Wildtyp-Pendants. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die PPAR β -Expression durch Muskeltraining induziert wird und Ligandenaktivierung ebenfalls zum Typ I Faser „switch“ führt (Wang *et al.*, 2004b).

Des Weiteren wurde in unterschiedlichen *in vitro* Studien die Induktion von Zielgenen, wie die der β -Oxidation von FA (z. B. *CPT1 α* , *Thiolase*), des Fettsäuretransports (*FATP* = „*fatty acid transport protein*“), des Elektronentransports (*UCP*) sowie der Glukoseoxidation (*PDK4* = *Pyruvat Dehydrogenase Kinase*) nach PPAR β Aktivierung beschrieben (Abbot *et al.*, 2005; Dressel *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004b). Neben seiner Rolle im Fettgewebe und Skelettmuskel konnten Lee und Kollegen auch eine wichtige Funktion in der Leber zeigen. Demnach induziert die Aktivierung von PPAR β in der Leber von *db/db* Mäusen die Glykolyse und Lipogenese und erhöht dadurch, zusammen mit der gesteigerten Fettverbrennung im Muskel, die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität. PPAR β Knockout-Mäuse sind dagegen glukoseintolerant (Lee *et al.*, 2006b). PPAR β kommt damit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fett- und Glukosehomöostase zu und prädestiniert den Rezeptor als pharmakologisches Ziel zur Behandlung von Adipositas und Typ II Diabetes.

1.2.8.2.2 Reverser Cholesteroltransport

Neben PPAR α und γ wurde auch für PPAR β eine Funktion bei der Steuerung des reversen Cholesteroltransports postuliert. Studien von Leibowitz *et al.* konnten zum ersten Mal zeigen, dass L165,041 in Insulin-resistenten Mäusen (*db/db*) zur Steigerung des Plasma-HDL führt (Leibowitz *et al.*, 2000). Unterstützt werden diese Daten durch eine Studie, die zeigen konnte, dass GW501516 in Insulin-restistenten Rhesus-Affen zu einem 79-%igen Anstieg des Plasma-HDLs sowie von Apolipoproteinen (apoA-I, apoA-II, apoC-III) bei gleichzeitiger Absenkung der LDL-Spiegel führt. Zudem sanken unter Nahrungsentzug die Blutfett- und Insulinwerte (Oliver *et al.*, 2001). Ähnliche Effekte von GW501516 auf HDL und apoA-I und II wurden auch in grünen Meerkatzen beobachtet (Wallace *et al.*, 2005). Weiterhin konnte in verschiedenen Ansätzen gezeigt werden, dass die PPAR β Aktivierung zur Induktion des reversen Cholesteroltransporters ABCA1 führt und es zu einer verminderten Aufnahme von Cholesterol im Darm kommt (Oliver *et al.*, 2001; van der Veen *et al.*, 2005). In der Leber von PPAR $\beta^{-/-}$ Mäusen führt im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Kontrollen die vermehrte Aufnahme von fettreicher Nahrung („*high fat diet*“) zu einer gesteigerten VLDL Produktion, einer verminderten Lipoproteinlipase Aktivität sowie zu einer verstärkten Expression der Lipoproteinlipase Inhibitoren Angptl3 und 4 („*angiopoietin-like*“ 3 und 4) (Akiyama *et al.*, 2004).

1.2.8.2.3 Arteriosklerose

Auch für PPAR β sind die Ergebnisse zu seiner Rolle in der Pathophysiologie der Arteriosklerose kontrovers. Wie unter 1.2.8.1 beschrieben, führt die Deletion bzw. Ligandenaktivierung des Rezeptors in Makrophagen durch Freisetzung des Repressorproteins BCL6 zur Repression von entzündungsfördernden Genen (z. B. *Mcp1* = „*chemoattractant protein 1*“; *Il1* = *Interleukin 1*; *Mmp9* = *Matrix metalloproteinase 9*), verbunden mit einer Reduzierung pro-atherogener Läsionen (Lee *et al.*, 2003a). Die positiven Auswirkungen auf die HDL- und VLDL-Blutwerte nach GW501516 Aktivierung (siehe Kapitel 1.2.8.2.2) und eine Steigerung des FA-Katabolismus (Lee *et al.*, 2006a und siehe Kapitel 1.2.8.2.1) tragen weiterhin zu den anti-atherogenen Eigenschaften bei. Dem gegenüber stehen Studien, wonach die Aktivierung des Rezeptors durch Induktion des Fettsäuretransporters CD36 und

Repression der Cholesterol-27-hydrolase und apoE Proteins zur vermehrten Lipideinlagerung in Makrophagen führt (Vosper *et al.*, 2001). Zudem konnte in zwei weiteren Studien für den Agonisten GW0742 kein (Li *et al.*, 2004) bzw. nur ein geringer (Graham *et al.*, 2005) Einfluss auf die Bildung von Schaumzellen bzw. atherogener Läsionen gezeigt werden. Des Weiteren konnte zwar in beiden Studien die Repression entzündungsfördernder Gene, aber keine Auswirkungen auf die HDL- oder LDL-Werte nachgewiesen werden.

Gründe für die teils widersprüchlichen Ergebnisse könnten in der Verwendung unterschiedlicher Liganden (GW501516 bzw. GW0742) und Ligandenkonzentrationen liegen.

1.2.8.2.4 Plazentaentwicklung

Ein Großteil der Nachkommen von PPAR β Knockout-Mäusen sind aufgrund von Plazentadefekten embryonal lethal (Barak *et al.*, 2002; Nadra *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2000). Barak und Kollegen (2002) konnten in ihrem konditionalen Knockout-Mäusen (PPAR δ^{ck}) an histologischen Schnitten zeigen, dass eine fehlerhafte Vernetzung zwischen dem embryonalen Plazentalabyrinth und der maternalen Dezidua, und nicht Defekte im Embryo selbst Ursache für die hohe Lethalität ist. Unterstützt werden diese Befunde durch *in situ* Hybridisierungen, wonach die PPAR β -Expression während der Nidation (Einnistung der Blastozyste) im Bereich der Dezidua deutlich ansteigt (Ding *et al.*, 2003a; Ding *et al.*, 2003b). Zudem beschrieben Nadra und Kollegen (2006) für ihr Knockout-Mausmodell (PPAR $\beta^{-/-}$), dass PPAR β für die Differenzierung von Trophoblaststammzellen in Riesenzellen („*giant cells*“) durch Regulation von direkten Zielgenen wie *I-mfa* („*Inhibitor of Mash2*“) und *Adrp* („*adipose differentiation-related protein*“) sowie durch die Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/Proteinkinase B = AKT) verantwortlich ist.

1.2.8.2.5 Reifung von Oligodendrozyten und Myelinisierung

Die Expression von PPAR β im Gehirn und im zentralen Nervensystem (ZNS) wurde mehrfach beschrieben (Braissant *et al.*, 1996; Cullingford *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 1995). In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte zudem

gezeigt werden, dass der Rezeptor in den für die Myelinisierung von Axonen verantwortlichen Oligodendrozyten exprimiert wird (Saluja *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 2003). Dort führt die spezifische Rezeptoraktivierung *in vitro* zur Reifung von primären Oligodendrozytenkulturen und zur Induktion spezifischer Myelin Proteine (MBP = „*myelin basic protein*“ und PLP = „*proteolipid protein*“) (Granneman *et al.*, 1998; Saluja *et al.*, 2001). Dementsprechend zeigen PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäuse eine verringerte Myelinisierung im Bereich des Corpus callosum im Vergleich zu ihren Wildtyp-Pendants (Peters *et al.*, 2000).

1.2.8.2.6 Differenzierung von Präadipozyten

Für die terminale Differenzierung von Adipozyten ist PPAR γ dringend erforderlich (Tontonoz *et al.*, 1994b). Wie mit Hilfe von PPAR β Knockout-Mäusen jedoch gezeigt werden konnte, ist PPAR β an der frühen Differenzierung von Präadipozyten beteiligt und induziert dort Gene, die für die weitere Differenzierung (*Ppar γ 2*) und die Lipideinlagerung (*Cd36*, *Fabp4*) benötigt werden (Bastie *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001; Matsusue *et al.*, 2004).

1.2.8.2.7 Differenzierung von Panethzellen im Dünndarm

Panethzellen (auch als Paneth-Körnerzellen bezeichnet) findet man in Dünndarmkrypten, wo sie durch Sekretion von Lysozymen und Defensinen zur Abwehr von mikrobiellen Erregern beitragen. Die Regulation der Differenzierung von Panethzellen erfolgt über negative Rückkopplung. Dabei verhindern die reifen Panethzellen die Differenzierung der Vorläuferzellen durch Sekretion des „*Indian Hedgehog*“ Proteins (IHH), welches in den Vorläuferzellen an seinen Rezeptor PTC-1 („*protein patched homolog 1*“) bindet und dort das Fortschreiten der Differenzierung unterdrückt. PPAR β reguliert diesen Mechanismus, indem es durch Inhibition von *Ihh* die Differenzierung von Vorläuferzellen in Panethzellen fördert (Varnat *et al.*, 2006).

1.2.8.2.8 Keratinozytendifferenzierung und Wundheilung

Der Einfluss von PPAR β auf die Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten konnte von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gezeigt werden. Die Aktivierung des Rezeptors führt dabei zur verstärkten terminalen Differenzierung der Keratinozyten, begleitet von der Induktion entsprechender Differenzierungsmarker (z. B. Loricrin; Fillagrin; Involukrin) und verringerter Zellteilungsaktivität (Burdick *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Michalik *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2000; Schmuth *et al.*, 2004; Westergaard *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit einer regulatorischen Rolle von PPAR β bei der Wundheilung wird die Expression des Rezeptors nach einer Verletzung der Haut und Cytokinfreisetzung über den AP-1 Signalweg induziert (Tan *et al.*, 2001). Weiterhin führt die Aktivierung von PPAR β durch endogene Liganden zur Stimulation des AKT/PKB Überlebens-Signalwegs sowie zur Repression von PTEN („*phosphatase and tensin homolog*“), was zu einer verstärkten Differenzierung und zur Resistenz der Keratinozyten gegenüber der TNF α -vermittelten Apoptose beiträgt (Di-Poi *et al.*, 2003; Di-Poi *et al.*, 2002; Michalik *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2001). Zudem erhöht PPAR β die Migration von Keratinozyten durch Stimulation von NF κ B und Induktion von MMP-9 (Di-Poi *et al.*, 2002; Michalik *et al.*, 2001). In der Haut ist PPAR β unter verschiedenen physiologischen Bedingungen damit ein entscheidender Regulator von Proliferation und Apoptose.

1.2.8.2.9 Tumorigenese

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Rolle von PPAR β bei der Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen dargestellt. Die Rolle des Rezeptors in der Tumorigenese ist jedoch vielfältig und wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Auf der einen Seite konnte in verschiedenen Tumoren eine erhöhte Expression des Rezeptors beobachtet werden (Gupta *et al.*, 2000; He *et al.*, 1999; Jaeckel *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Suchanek *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2000). Zudem führte Ligandenaktivierung zur Inhibition der Apoptose und / oder zu einer verstärkten Zellproliferation verschiedener Tumoren und Tumorzelllinien, teilweise durch Aktivierung des AKT-Signalwegs, Inhibition von PTEN bzw. durch Induktion der Cyclooxygenase 2 (Cox2) und / oder von VEGF („*vascular endothelial growth factor*“)

(Glinghammar *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2008; Stephen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004a; Xu *et al.*, 2006a; Xu *et al.*, 2006b). Des Weiteren ist PPAR β als negativ reguliertes Zielgen des Tumorsuppressors APC („*adenomatous polyposis coli*“) in Kolorektaltumorzellen beschrieben und wird durch Bindung von β -Catenin/Tcf4 („*transcription factor 4*“) an seinen Promotor induziert (He *et al.*, 1999). In APC^{Min}-Mäusen verstärkt die Aktivierung des Rezeptors das Wachstum intestinaler Tumoren, während die Deletion des Rezeptors in APC^{Min/+}-Mäusen das Tumorstadium vermindert (Gupta *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004a). Dem gegenüber konnten Barak und Kollegen zeigen, dass die Polypenbildung in APC^{Min}-Mäusen unabhängig von PPAR β ist (Barak *et al.*, 2002). Weiterhin konnte in zwei weiteren Studien eine erhöhte Prädisposition bzw. Tumorstadium in APC^{Min}-Mäusen nach Deletion von PPAR β gezeigt werden (Harman *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2004). Unterstützt werden diese Daten durch eine Studie, in der die PPAR β -RNAi Behandlung humaner Kolonkarzinomzellen (HCT116) zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation führte (Yang *et al.*, 2008). Vergleichbares konnte auch in PPAR β ^{-/-}-Mäusen festgestellt werden, die nach chemisch-induzierter Tumorstadium eine höhere Anzahl intestinaler Polypen aufwiesen. Zudem zeigte die Ligandenaktivierung von PPAR β in entsprechenden Wildtypkontrollen eine verstärkte Expression von Differenzierungsmarkern und eine erhöhte Apoptoserate (Marin *et al.*, 2006). Die Gründe für die teils widersprüchlichen Ergebnisse zur Rolle von PPAR β bei der intestinalen Tumorstadium konnten bislang nicht geklärt werden. Allerdings zeigt sich übereinstimmend mit der Funktion von PPAR β in der Regulation von Differenzierung in unterschiedlichen Zelltypen (siehe Kapitel 1.2.8.2.4 - 1.2.8.2.8) nach Ligandenaktivierung auch in vielen anderen Tumorzelllinien ein anti-proliferativer Effekt, teils verbunden mit der Induktion von Differenzierung und Apoptose (Aung *et al.*, 2006; Girroir *et al.*, 2008a; Hollingshead *et al.*, 2007a; Hollingshead *et al.*, 2007c). Und auch bei der Entstehung von chemisch-induziertem Hautkrebs sowie in durch Raf-induzierten Lungenadenomen konnte ein protektiver Effekt von PPAR β nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Müller-Brüsselbach, *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005).

Obwohl die Rolle bei der Differenzierung verschiedener Zelltypen sowie in Tumorzellen auf eine anti-karzinogene Funktion von PPAR β hinweist, ist aufgrund der Vielzahl an widersprüchlichen Daten keine abschließende Aussage möglich. Um die

Rolle von PPAR β in der Tumorigenese weiter zu untersuchen wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ein PPAR β -spezifisches Maustumormodell etabliert, dessen Phänotyp als Grundlage für die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit diene. Im abschließenden Kapitel soll daher noch ein kurzer Überblick über das Maustumormodell und dessen Phänotyp gegeben werden.

1.2.8.3 PPAR β Maustumormodell

Um die Rolle des Tumorstromas bei der PPAR β -abhängigen Tumorigenese von Lungenkarzinomen zu untersuchen, wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ein syngenes Maustumormodell etabliert. Dazu wurden LLC-Tumoren („*Lewis Lung Carcinoma*“) in PPAR β Wildtyp- und Knockout-Mäuse injiziert und die Auswirkungen des genetischen Hintergrunds auf die Tumorphiliferation analysiert

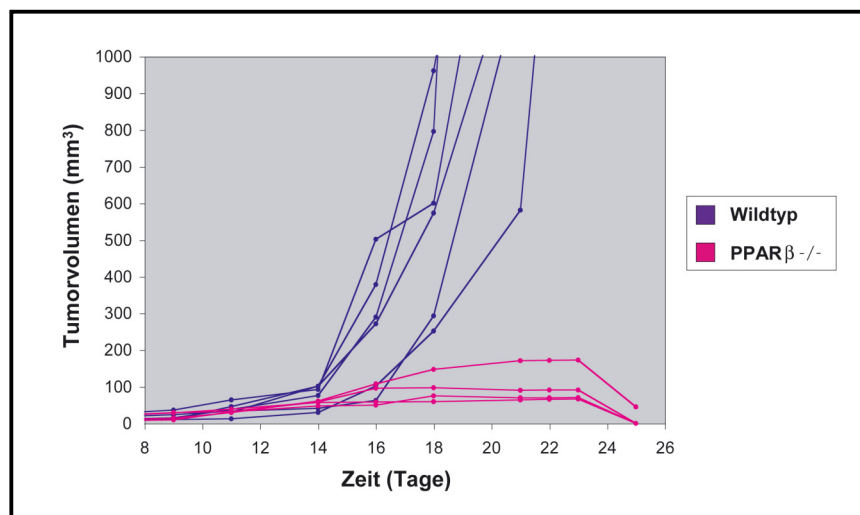


Abb. 1.4: Wachstum von LLC-Tumoren in Wildtyp- und PPAR $\beta^{-/-}$ Mäusen. 1×10^6 Lewis-Lung-Carcinoma Zellen (LLC) wurden subkutan in die seitliche Rückenflanke von Wildtyp- und PPAR $\beta^{-/-}$ -Mäusen gespritzt und nach den angegebenen Zeiträumen die Tumorgröße bestimmt und das Tumolvolumen wie folgt berechnet: $\text{Breite}^2 \times \text{Länge} / 2$. Mäuse mit nekrotischen Tumoren oder Tumolvolumina von 1000 mm^3 wurden vorzeitig getötet. (Verändert nach Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007).

Wie in Abb. 1.4 dargestellt, kommt es in *Pparb*-defizienten Mäusen nach anfänglicher Proliferation zu einer Wachstumsverzögerung und innerhalb von 24 Tagen zu einer vollständigen Remission der Tumoren. Im Gegensatz dazu führten die gleichen Tumoren in *Pparb*^{+/+}-Mäusen im selben Zeitraum zum Tod der Versuchstiere. Die immunhistologische Untersuchung der Tumoren konnte zeigen, dass in *Pparb*^{-/-}-

Mäusen, im Gegensatz zum Wildtyp, ein deutlich höherer Anteil der Blutgefäße abnormale Strukturen aufweist. Während im Wildtyp nach Aquaporin-1 (AQP-1) Immunfärbung Endothelzellen (EC) in dünnwandigen Blutgefäßen mit einem offenen Lumen und Erythrozyten nachzuweisen sind (siehe Abb. 1.5.A), findet man diese normalen Strukturen in *Pparb*^{-/-}-Mäusen nur selten. ECs findet man hier in abnormalen Strukturen von Blutgefäßen ohne Lumen und häufig in Bereichen von nekrotischem Tumorgewebe. Eine erhöhte Anzahl an Immunzellen (Makrophagen, Neutrophile, Lymphozyten) konnte jedoch weder im Wildtyp noch im Knockout nachgewiesen werden. Die Quantifizierung von AQP-positiven Strukturen und normalen Blutgefäßen konnte zudem zeigen, dass in Tumoren aus *Pparb*^{-/-}-Mäusen dreimal mehr AQP-positive Strukturen nachzuweisen sind; davon aber nur 11,8 % normale, funktionstüchtige Blutgefäße bilden (siehe Abb. 1.5.B). Des Weiteren exprimieren signifikant mehr ECs in diesen Strukturen den Proliferationsmarker PCNA („*proliferating cell nuclear antigen*“) im Vergleich zum Wildtyp.

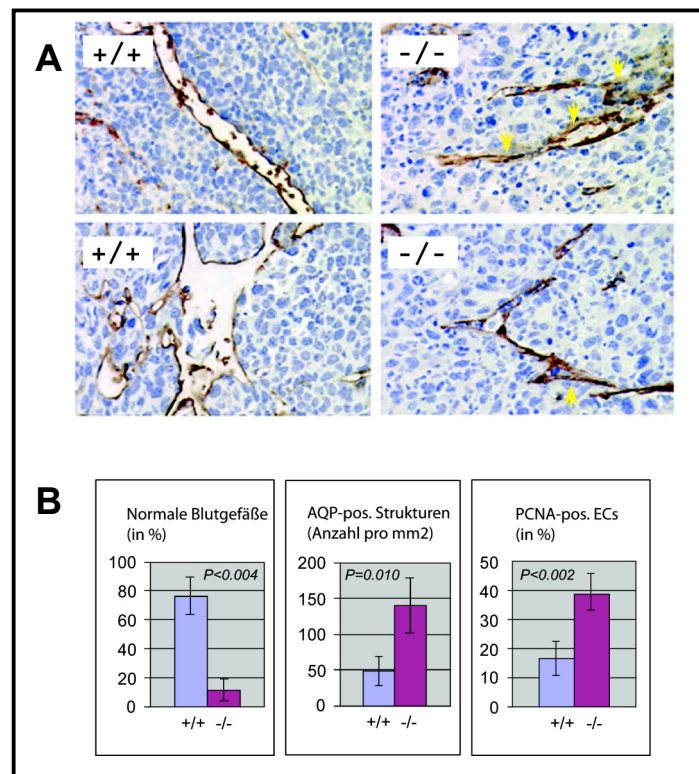


Abb. 1.5: Immunhistologische Analyse von Endothelzellen (EC) in LLC-Tumoren. **A)** Aquaporin-1 (AQP-1) Immunfärbung (braun) von EC und Blutgefäßen subkutaner LLC-Tumoren 14 Tage nach Injektion in PPAR β Wildtyp (+/+) und Knockout-Mäuse (-/-) (50-fache Vergrößerung). Nekrotische Tumorbereiche findet man in direkter Nachbarschaft von abnormalen Blutgefäßstrukturen in *Pparb*^{-/-}-Mäusen (rechts: Pfeile). **B)** Quantitative Auswertung von normalen Blutgefäßen (rechts), AQP-1 positiven Strukturen (Mitte) und PCNA-positiven ECs (links) in LLC-Tumoren von *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Mäusen. Signifikante Unterschiede (p-Wert ist angegeben) ermittelt mit Students *t*-Test. (Verändert nach Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007).

Insgesamt lassen diese Befunde auf ein hyperplastisches Tumorendothel schließen. Weitere Experimente konnten zudem zeigen, dass der Blutfluss durch die abnormalen Gefäßstrukturen und damit die Versorgung des Tumors in den Knockout-Mäusen deutlich eingeschränkt ist (Daten nicht gezeigt).

Die Auswirkungen der *Pparb*-Deletion auf die Tumorangiogenese konnten auch in einem alternativen *in vivo* Angiogenese-Assay gezeigt werden (Ley *et al.*, 2004). Im sogenannten Matrigel-Plug Assay wird Matrigel, eine Substanz bestehend aus extrazellulärer Matrix, vermischt mit den angiogenen Wachstumsfaktoren Prostaglandin E₂ (PGE₂) und FGF-2 („*basic fibroblast growth factor*“) analog den LLC-Tumoren in die Mäuse injiziert. Durch die Wachstumsfaktoren kommt es zur Neovaskularisierung der Plugs durch einwachsende Wirts-Endothelzellen. Drei Tage nach ihrer Implantation in *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Mäusen zeigten die in die Plugs eingewachsenen Gefäße und ECs einen mit denen in den LLC-Tumoren vergleichbaren Phänotyp (Abb. 1.6).

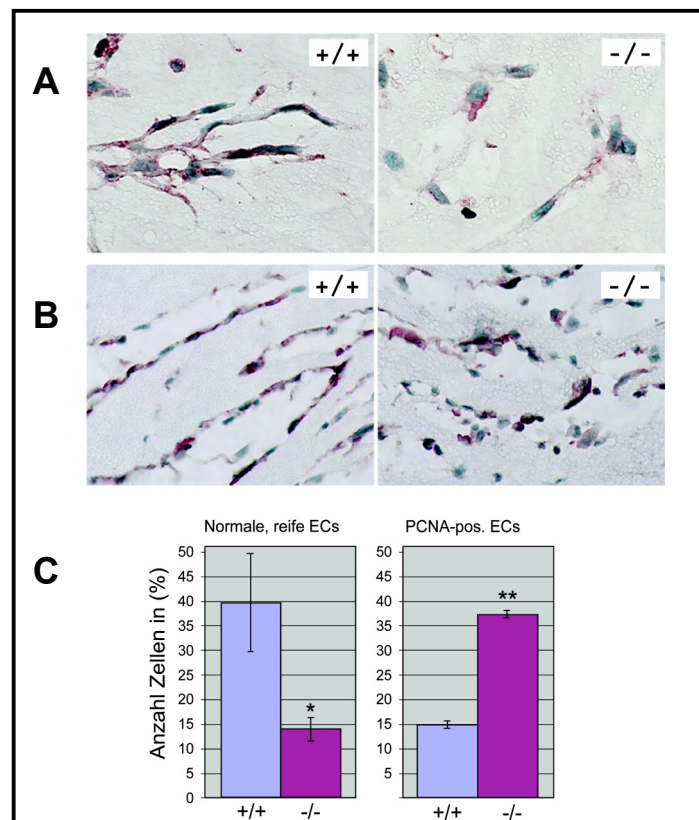


Abb. 1.6: In vivo Angiogenese Assay in *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Mäusen. Matrigel mit angiogenen Wachstumsfaktoren (bFGF und PGE₂) wurde *Pparb* Wildtyp und Knockout-Mäusen subkutan in die seitliche Rückenflanke injiziert, nach drei Tagen wieder entnommen und immunhistologisch analysiert. **A)** und **B)** AQP-1 Immunfärbung (braun) von in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Matrigel-Plugs mit Endothelzellen (EC). **A)** Formierung von netzwerkartigen Strukturen durch eingewachsene ECs und **B)** fortgeschrittene Angiogenese mit Blutgefäßen jeweils nur in *Pparb*^{+/+} Mäusen. Vergrößerung **A)** 100-fach und **B)** 50-fach. **C)** Quantifizierung von morphologisch reifen (links) und PCNA-positiven (rechts) ECs in Matrigel-Plugs. */**Statistisch signifikante Unterschiede zu *Pparb*^{+/+} für p<0.05 (Students *t*-Test). (Verändert nach Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007).

Insgesamt führt die Deletion des Rezeptors in diesem Tumormodell sowie im Matrigel-*Plug Assay* zu einer verstärkten Proliferation und verminderten Differenzierung von Endothelzellen, was zu einem hyperplastischen Phänotyp und einer gestörten (Tumor-) Angiogenese beiträgt. Aufgrund derer kommt es zu einer Mangelversorgung der LLC-Tumorzellen, was zur Remission der Tumoren führt.

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die intensive Erforschung von PPAR β in den letzten Jahren konnte eine Vielzahl an Funktionen des Rezeptors aufdecken, die von der Regulation des Fettstoffwechsels und der Energiehomöostase bis zur Regulation von Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose reichen (siehe Kapitel 1.2.8.2). Eine neue Funktion des Rezeptors in der Tumorangio-genese konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe *Pparb*-defizienter Mäuse aufgedeckt werden (siehe Kapitel 1.2.8.3).

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung potentieller PPAR β Zielgene in Zelltypen des Tumorstromas und deren Validierung und Charakterisierung in unterschiedlichen zellulären Testsystemen. Des Weiteren sollte durch funktionelle Analysen ein möglicher Zusammenhang zwischen bestimmten Zielgenen und dem hyperplastischen Tumorstroma in *Pparb*-defizienten Mäusen gezeigt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss von verschiedenen spezifischen Liganden und zellulären Fettsäuretransportproteinen auf die transkriptionelle Regulation von PPAR β Zielgenen untersucht werden.

Mögliche posttranslationale Modifikationen von PPAR β und deren Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des Rezeptors waren Thema des dritten Teils dieser Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.1.1 DNA und RNA Standardmethoden

2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab (Midipräp)

Die Präparation von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad erfolgte mit Hilfe des „NUCLEOBOND® AX“ bzw. „NUCLEOBOND® XTRA MIDI“ Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren). Das Prinzip dieses Aufbereitungskits liegt in der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der anschließenden Bindung von Plasmid-DNA an eine Silica-Gel Matrix. Die Bindung und das Ablösen von der Silica-Matrix erfolgt dabei durch Ionenaustausch.

Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Zunächst wurde eine Bakterienkultur in 100 ml LB-Amp Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Die Übernachtskultur wurde dann 15 min bei 4 °C und 3000 UpM abzentrifugiert, das Pellet in S1-Puffer resuspendiert, 5 min mit S2-Puffer lysiert und mit S3 Puffer neutralisiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte über NUCLEOBOND®-AX 100 bzw. XTRA MIDI Säulen. Die von der Säule eluierte Plasmid DNA wurde durch Isopropanolfällung präzipitiert und mit 70 % Ethanol (EtOH) gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde je nach Größe in 50 - 400 µl *Aqua ad iniectabilia* (A. a. i.) resuspendiert und die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.1.1.5).

So gewonnene Plasmid-DNA wurde für Klonierungen, Sequenzierungen und Transfektionen (siehe Kapitel 2.1.6; 2.1.1.13; 2.3.1) verwendet.

2.1.1.2 Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA (Minipräp)

In Anlehnung an das Protokoll zur Isolierung großer Mengen Plasmid DNA (siehe Kapitel 2.1.1.1) wurden auch kleinere Mengen Plasmid-DNA z. B. zur schnellen Überprüfung von Klonen nach Klonierungen isoliert. Dazu wurden 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur 1 min bei 13000 UpM abzentrifugiert, das Bakterienpellet

anschließend in 200 µl kaltem S1 Puffer resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 400 µl S2 Puffer für 5 min lysiert. Die nach Zugabe von 300 µl S3 Puffer ausgefällten Proteine wurden durch zweimaliges abzentrifugieren des Überstandes in jeweils neuen 2 ml bzw. 1,5 ml Reaktionsgefäßen entfernt. Die Plasmid-DNA wurde dann durch Fällung des Überstandes mit 1 Vol (900 µl) EtOH und 5-minütiger Zentrifugation bei 13000 UpM pelletiert, mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 10 - 20 µl A. a. i. resuspendiert. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde in erster Linie für Kontrollverdaus mit Restriktionsendonukleasen eingesetzt (siehe Kapitel 2.1.1.6), in Ausnahmefällen jedoch auch als „*Template*“ für Sequenzierungen bzw. PCRs (siehe Kapitel 2.1.1.13; 2.1.3) benutzt.

2.1.1.3 Isolierung von RNA aus Zellkulturen und Mausgeweben

Die besondere Gefahr beim Arbeiten mit RNA bzw. bei der Isolierung von RNA gleich welcher Herkunft, liegt in ihrer sehr schnellen Degradation durch RNasen. Daher ist es dabei besonders wichtig und semisteril zu arbeiten.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des „NUCLEOSPIN® RNA II“ Kit der Firma Macherey&Nagel (Düren) nach Herstellerangaben. Dabei wird die RNA an eine Silica-Gel Matrix gebunden. Die im Lysis- und Waschpuffer enthaltenen chaotropen Ionen (z. B. Guanidin-Thiocyanat) führen zu einer Inhibition von RNasen und verhindern so die Degradation der RNA während der Isolierung. Die ebenfalls an die Silica-Säule bindende genomische DNA wurde durch einen 15-minütigen rDNase-Verdau (rekombinante RNase-freie DNase) direkt auf der Säule entfernt. Nach der Elution der RNA in 40 - 50 µl A. a. i. wurde die Konzentration und die Reinheit der RNA photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.1.1.5). 0,1 bis 1 µg Gesamt-RNA wurden als „*Template*“ für die Erststrang cDNA-Synthese eingesetzt (siehe Kapitel 2.1.4). RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Die Gewinnung von RNA aus Geweben erfolgte ebenfalls nach oben beschriebener Methode. Dazu wurden ca. 10 mg Gewebe unter zur Hilfenahme eines Ultra Turrax (IKA Labortechnik, Staufen) lysiert und die RNA über die Silica-Säulen aufgereinigt.

2.1.1.4 Parallele Isolierung von RNA und Protein aus einer Probe

Die parallele Isolierung von RNA und Proteinen aus einer Probe erfolgte mit Hilfe des „NUCLEOSPIN® RNA/PROTEIN“ Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren) nach Herstellerangaben. Die Isolierung der RNA erfolgte dabei genau wie unter 2.1.1.3 beschrieben. Zur Gewinnung der Proteine wurde der Durchfluss nach Bindung der Nukleinsäuren an die Silica-Säulen mit 1 Vol. Präzipitationspuffer (PP) gemischt und die Proteine ausgefällt. Nach einem Waschschrift mit 50 % EtOH wurde das Pellet bei RT getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren Licht aufgrund ihrer heterozyklischen Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm. Diese Eigenschaft nutzt man sich bei der photometrischen Quantifizierung von Nukleinsäuren. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei dem Gehalt von ca. 40 µg / ml RNA bzw. 50 µg / ml doppelsträngiger-DNA (dsDNA). Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäureprobe wird zusätzlich die OD bei 280 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren Phenol und Proteine das UV-Licht. Der Quotient von OD_{260}/OD_{280} ergibt somit ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-haltigen Proben erfolgte durch Messung der Absorption von 1 µl unverdünnter Probe am NanoDrop (Pepqlab, Erlangen). Die Konzentration konnte direkt aus der Software (NanoDrop 3.01) abgelesen werden, die diese nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konz. RNA [ng / µl]} = OD_{260} \times 40 \text{ ng / µl}$$

$$\text{Konz. dsDNA [ng / µl]} = OD_{260} \times 50 \text{ ng / µl}$$

2.1.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen des Typ II erkennen spezifische DNA Sequenzen (häufig Palindrome) und schneiden spezifisch innerhalb dieser Erkennungssequenz. Der Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers und unter Verwendung der empfohlenen Puffer. In der Regel wurden 0,5 - 2 µg für analytische und 5 - 20 µg DNA für

präparative Ansätze in 20 - 100 µl Volumen für 2 - 4 h nach Herstellerangaben verdaut. Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt), Fermentas (St. Leon-Rot) und Invitrogen (Karlsruhe).

2.1.1.7 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es möglich, geladene Moleküle im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle hängt dabei von der angelegten Spannung, der Trennmatrix und der Molekülgröße ab.

Zur Auftrennung von DNA dienten 0,5 - 2-%ige horizontale Agarosegele mit 0,5 µg / ml Ethidiumbromid. Die DNA wurde vor der Elektrophorese mit 1 / 5 (v / v) Ladepuffer versetzt. Dieser dient dem Absinken der DNA in die Geltaschen sowie zur Markierung der Laufront. Die Auftrennung erfolgte bei 80 - 140 V Spannung mit 1 x TAE als Laufpuffer. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „*Low Range*“-Marker bzw. 1 kb-Marker (Fermentas, St. Leon-Rot) mit aufgetragen.

Zur Darstellung der aufgetrennten Nukleinsäuren wurden die Gele dann unter UV Licht bei $\lambda = 312$ nm ausgewertet. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe des Gel-Imaging-Systems der Firma Biorad (München) und des Video Copy Processor (Mitsubishi, Japan)

2.1.1.8 Wiedergewinnung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Spezifische DNA Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe Kapitel 2.1.1.7) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und säulenchromatographisch mit Hilfe des „NUCLEOSPIN® EXTRACT II“ Kits (Macherey&Nagel, Düren) entsprechend den Herstellerangaben eluiert.

2.1.1.9 Ligation

Die Ligation von mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA Fragmenten in rekombinante Vektoren erfolgte mit Hilfe der T4-DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden Fragmente mit kohäsiven, kompatiblen Enden (sog. „*sticky ends*“) in einem Reaktionsansatz von 20 µl und 0,5 U T4 Ligase für 2 - 4 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zu Ligationen von Fragmenten mit stumpfen, glatten Enden (sog. „*blunt ends*“) wurde zusätzlich

5 % (w / v) PEG4000 (Polyethylenglycol) hinzugefügt, die Ligation erfolgte dann über Nacht bei 4°C.

Um die Spezifität der Ligation zu erhöhen und die Religation des Vektors zu verhindern, wurde der geschnittene Vektor vor der Ligation an den 5'-Enden durch Inkubation mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIAP; Life Technologies, Karlsruhe), entsprechend den Herstellerangaben, dephosphoryliert.

2.1.1.10 Transformation

Für die Transformation von Ligationsprodukten in kompetente Bakterien wurden 10 µl Ligationsansatz, bzw. 4 µl des pCR®2.1-TOPO® Vektor Ligationsansatzes (siehe Kapitel 2.1.6.1), mit 150 µl kompetenten *E. coli* Bakterien (XL1-Blue) vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Ein 90 sec. andauernder Hitzeschock bei 42 °C führte zur Aufnahme des Vektors in die Bakterienzelle. Nach 1 - 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium aufgenommen und anschließend die Vorkultur 45 min - 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator (180 UpM) angezogen.

Von den pCR®2.1-TOPO-Ligationen (siehe Kapitel 2.1.6.1) wurden 50 µl bzw. 200 µl der Vorkultur auf LB-Agarplatten (100 µg / ml Ampicillin) ausplattiert und für 16 - 20 h bei 37 °C inkubiert. Vorkulturen von Standardligationen wurden 5 min bei 1500 UpM abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert und die Bakterien anschließend auf LB-Agarplatten (mit entsprechendem Selektionsantibiotikum) ausgestrichen. Die Anzucht der Bakterienklone erfolgte ebenfalls für 16 - 20 h bei 37 °C. Die erfolgreiche Klonierung wurde anschließend mittels PCR (siehe Kapitel 2.1.3) bzw. durch Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.1.1.6) nach Minipräparation (siehe Kapitel 2.1.1.2) überprüft.

Die Retransformation von Plasmiden für quantitative Präparationen (siehe Kapitel 2.1.1.1) erfolgte ebenfalls nach oben beschriebenem Protokoll. Dafür wurden 0,5 - 1µl Plasmid (mindestens 10 ng / µl) zu 150 µl kompetenten Bakterien gegeben. Die weitere Behandlung erfolgte entsprechend oben beschriebenem Protokoll. Anschließend wurden jedoch maximal 200µl Vorkultur auf Selektions-LB-Agarplatten ausgestrichen, parallel wurde mit der restlichen Vorkultur eine Übernachtskultur (üblicherweise 100 ml LB-Medium + Selektionsantibiotikum) angeimpft.

2.1.1.11 Verwendete *E. coli* Bakterienstämme

Bei den im Rahmen dieser Dissertation verwendeten *Escherichia coli* Bakterien handelte es sich um die Stämmen DH5 α und XL-1 Blue mit folgenden Genotypen:

E. coli Stamm DH5 α

Genotyp: supE44 lacU169 (80lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA69 thi-1 relA149

E. coli Stamm XL1Blue

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac f'ZAM15 Tn10(ter^r)]

Nähere Erläuterungen hierzu siehe (Sambrook, 1989).

2.1.1.12 Herstellen von kompetenten Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde ein Einzelklon *E.coli* XL-1Blue in 10 ml antibiotikafreiem LB-Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. 5 ml dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen in einen Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ (Optische Dichte bei 600 nm) von 0,4 bei 37 °C im Schüttelinkubator weiter inkubiert. Bei dieser OD befinden sich die Bakterien in einer logarithmischen Wachstumsphase, was später zur verbesserten Aufnahme von Fremd-DNA in die Bakterien (Transformation) beiträgt. Nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,4 wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und bei 3000 UpM (4 °C) pelletiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 200 ml eiskalter 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (3000 UpM, 15 min, 4 °C) wurden die Bakterien in 20 ml eiskalter 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert, 2 h auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 5 ml Glycerin (Endkonzentration von 20 % v / v) in 500 μ l Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.1.1.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte als Auftragsequenzierung bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg). Dazu wurde 1 μ g lyophilisierte DNA und spezifische Sequenzierprimer (10 μ l / 2 pmol) zu MWG Biotech geschickt, bzw. die von MWG zur Verfügung gestellten Standardsequenzierprimer verwendet. Das Ergebnis der Sequenzierung stand nach 2 - 4 Werktagen per Email zur Verfügung.

2.1.2 Computerauswertung und Datenbankanalysen

Sequenzierungsdaten und Sequenzdaten aus frei zugänglichen Datenbanken (s. u.) wurden mit dem Programm „Lasergene ® Version 5.5.2“ (DNASar Inc., USA) und den darin enthaltenen Programmteilen ausgewertet. Des Weiteren wurden mit diesem Programm Restriktionskarten erstellt und Primer für PCRs entworfen. Neben diesem kommerziellen Programm wurde, insbesondere zum Designen von speziellen qPCR-Primern, zusätzlich auf kostenlose Internetprogramme und Datenbanken zurückgegriffen (siehe Kapitel 2.11.6).

Für „*in silico*“ Untersuchungen, Datenbankanalysen und Homologievergleiche wurde in der Regel mit den frei zugänglichen Datenbanken und Programmen des NCBI („*US National Center for Biotechnology Information*“; <http://www.ncbi.nih.gov>) und des Ensembl Genom Datenbank Projektes („*The Ensembl genome database project*“; <http://www.ensembl.org>), sowie dem UCSC „*Genom Browser*“ (<http://genome.ucsc.edu>) gearbeitet.

2.1.3 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der PCR („*polymerase chain reaction*“) Technik (Saiki *et al.*, 1988) ist es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte unter Zuhilfenahme spezifischer Primer zu amplifizieren. Durch den Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase erfolgt die Amplifikation in einer zyklischen Reaktion in drei Temperaturschritten. In einem Thermocycler mit beheiztem Deckel (Robocycler; Stratagene, Niederlande) erfolgt zuerst ein einleitender Denaturierungsschritt (95 °C; 7 min), danach folgt die zyklische Reaktion. Auf die Hitzedenaturierung (95 °C; 1 min) folgt die sequenzspezifische Anlagerung der Primer („*annealing*“: 54 - 62 °C; 1 min) und anschließend der Polymerisationsschritt (72 °C; 1 min), bei dem das freie 3'-OH-Ende des gebundenen Primers von der Polymerase durch den Einbau entsprechender Nukleotide in 3'-Richtung verlängert wird. Ein finaler Polymerisationsschritt (72 °C; 10 min) dient der Vervollständigung der Doppelstränge. Je nach Art und Größe der DNA-Matrize wurde das Standardprogramm entsprechend angepasst. In 0,2 ml Reaktionsgefäßen wurden 25 µl Gesamtansatz, bestehend aus 12,5 µl 2 x ImmoMixRED (Bioline, Offenbach), je 25 µM der beiden Oligonukleotidprimer sowie Wasser (A. a. i.), vorbereitet. Als DNA-Matrize dienten 1 - 2 µl Plasmid- oder cDNA. Mitgeführte

Positivkontrollen dienten der funktionellen Kontrolle der Methodik. Negativkontrollen mit A. a. i. als „*Template*“ wurden standardmäßig mitgeführt und dienten der Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen. Neue Primerpaare wurden zunächst in einer Gradienten-PCR (Gradient: 54 - 62 °C) zur Ermittlung ihrer optimalen Anlagerungstemperatur getestet. Die Analyse der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte auf 0,5 - 2-%igen Agarosegelen (siehe Kapitel 2.1.1.7). Durch den im ImmoMixRED enthaltenen Farbstoff konnten die Amplifikate ohne weitere Zugabe von Ladepuffer direkt auf die Gele aufgetragen und analysiert werden.

2.1.4 Erststrang cDNA-Synthese und RT-PCR (reverse Transkription PCR)

Mittels reverser Transkription ist es möglich, RNA-Transkripte in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Die so erhaltene cDNA kann dann mittels PCR bzw. qPCR (siehe Kapitel 2.1.3 bzw. 2.1.5) weiter charakterisiert werden. Durch die Verwendung von Oligo dT-Primern wird die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben.

Die Herstellung der cDNA erfolgte mit Hilfe des Omniscript® cDNA Synthese Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Dazu wurden gleiche Mengen RNA (0,1 bis 1 µg) in 20 µl Gesamtreaktionsansätzen bei 37 °C für 60 - 70 min inkubiert.

Reverse Transkription cDNA-Synthese-Mix:

End-Konz.	Reaktionskomponente	20 µl Gesamtansatz
1 x	10 x RT-Puffer (Omniscript® Kit, Qiagen)	2 µl
1 µM	Oligo (dT)-Primer (Roche, Mannheim)	2 µl
0,5 mM je dNTP	dNTP-Mix (Omniscript® Kit, Qiagen)	2 µl
0,5 U / µl	RNase-Inhibitor (Eppendorf)	0,33 µl
0,2 U / µl	Omniscript Reverse Transkriptase (Omniscript® Kit, Qiagen)	1 µl
0,1 bis 1 µg	RNA	0,5 bis 1 µg
	A a. i.	Ad 20 µl

Um Kontaminationen mit Fremd-DNA zu vermeiden, wurden die Ansätze stets mit gestopften Spitzen zusammenpipettiert. Die so hergestellte cDNA diente anschließend

als „*Template*“ in einer normalen PCR bzw. quantitativen RT-PCR (qPCR) zur Validierung von Expressionsprofilen (siehe Kapitel 2.1.3 bzw. 2.1.5).

2.1.5 Quantitative RT-PCR (qPCR bzw. „*real-time*“ PCR)

Mit Hilfe der quantitativen PCR ist es möglich, Expressionsprofile von Genen in einer spezifischen RNA (cDNA) Population in Echtzeit („*real-time*“) zu analysieren. Voraussetzung dafür ist, dass zunächst die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wird (siehe Kapitel 2.1.4). Die so erhaltene komplementäre DNA (cDNA) dient anschließend in der qPCR als „*Template*“. Bei den hier durchgeführten qPCRs handelt es sich um *SYBR*[®]-*Green* basierte *Assays*. Dabei macht man sich zu Nutze, dass *SYBR*[®]-*Green* unspezifisch in doppelsträngiger-DNA (dsDNA) interkaliert und nach entsprechender Anregung fluoresziert. Die Fluoreszenzsignale werden während eines PCR-Laufs nach jedem Amplifikationsschritt gemessen. Da sich die Fluoreszenzsignale proportional zur dsDNA verhalten und während der PCR nur Gen-spezifische Sequenzen amplifiziert werden, ist anschließend eine quantitative Aussage über das ursprüngliche Expressionsniveau des Gens möglich.

Aufgrund der unspezifischen Interkalierung von *SYBR*[®]-*Green* in dsDNA jeglichen Ursprungs (spezifisches Amplifikat, Primer-Dimere und unspezifische Amplifikate) ist die Überprüfung der Spezifität der Amplifikate anhand von Schmelzkurven am Ende des PCR-Laufs unerlässlich.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden sämtliche Pipettierschritte mit gestopften Pipettenspitzen durchgeführt.

qPCR Reaktionen wurden standardmäßig als Triplikate angesetzt. Dazu wurde ein Gen-spezifischer Mastermix, bestehend aus 2 x ABsolute QPCR *SYBR*[®]-*Green* Mastermix (Thermo Fischer Scientific, Hamburg), Primermix und sterilem Wasser (A. a. i.), in die Vertiefung einer weißen 96'*well* Platte (Thermo Fischer Scientific, Hamburg) vorgelegt und diesem anschließend 5 µl einer 1 : 50 vorverdünnten cDNA beigefügt. Die Durchführung erfolgte in einem Mx3000P qPCR Gerät (Stratagene, Niederlande) für 40 Zyklen nach einem Standardprotokoll (s. u.) mit anschließender Schmelzkurve. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Mx3000P Software der Firma Stratagene (Niederlande) sowie dem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel (Microsoft, Unterschleißheim)).

Grundsätzlich wurden die erhaltenen Expressionsdaten mit Hilfe der Mx3000P

Software auf das „housekeeping“-Gen *Rpl27 (L27)* bzw. *Rplp0 (Arp0)* normalisiert und die Daten als relative Expression zu einem selbst bestimmten Kalibrator dargestellt.

Standard-qPCR Programm

1. 95 °C 15 min Taq Aktivierung
 2. 95 °C 30 sec Denaturieren
 3. 60 °C 30 sec *Annealing*
 4. 72 °C 30 sec Polymerisation
- 40Zyklen
5. Schmelzkurve von 60 °C bis 95 °C
(0,5 °C Erhöhung je Zyklus; 70 Zyklen)

Ansatz qPCR-Mix (25 µl)

- 12,5 µl 2xABSolut QPCR *SYBR*[®]-Green
Mastermix (Thermo Fischer Scientific, Hamburg)
- 0,5 µl Primermix [je Primer 10 µM]
- 7 µl A a. i.
- 5 µl cDNA (Verdünnung 1 : 50)

2.1.6 Subklonierung von DNA Fragmenten

Für die Umklonierung von Vektorfragmenten in einen anderen Vektor wurde das entsprechende Fragment üblicherweise mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten (siehe Kapitel 2.1.1.6), anschließend über ein Agarose-Gel aufgereinigt (siehe Kapitel 2.1.1.7) und in den entsprechenden Zielvektor, der vorher ebenfalls mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert wurde, eingefügt (siehe Kapitel 2.1.1.9). Eine Übersicht der im Rahmen dieser Dissertation verwendeten neu und umklonierten Vektoren und der dazugehörigen Klonierungsstrategien sind im Kapitel 2.11.8 dargestellt.

2.1.6.1 Klonierung von PCR Fragmenten in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor

Die Klonierung von PCR-Produkten in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor erfolgte mit Hilfe des „TOPO TA Cloning[®] Kits“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers.

Bei der PCR-Amplifikation wird durch die Matritzen-unabhängige Transferaseaktivität der Taq-Polymerase in 50 % der Fälle ein einzelnes 3'-desoxy-Adenosin an das PCR-Produkt angehängt. Der linearisierte pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor enthält die Topoisomerase I des *Vaccinia Virus* kovalent gebunden, zusätzlich verfügt er über ein überhängendes 3'-desoxy-Thymidin, wodurch PCR-Produkte direkt in den Vektor kloniert werden können.

Die Topoisomerase spaltet das Phosphodiester-Rückgrat der DNA (Shuman, 1991). Durch die freiwerdende Energie wird die Topoisomerase kovalent an den gespaltenen Strang gebunden. Diese Bindung kann jedoch sehr schnell durch eine 5'-Hydroxylgruppe eines DNA-Stranges angegriffen werden. Dadurch wird die Topoisomerase wieder freigesetzt und der DNA-Strang (hier: PCR-Produkt) wird kovalent mit dem Vektor verknüpft (Shuman, 1994).

Für die Ligation von PCR-Produkten in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) wurden nach gelelektrophoretischer Überprüfung des PCR-Produktes 1 - 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor und 1 µl einer im Kit enthaltenen Salz-Lösung zusammenpipettiert und der Ligationsansatz 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation von kompetente XL-1 Blue *E. coli* Bakterien und die Anzucht von Einzelklonen auf LB-Amp-Platten (siehe Kapitel 2.1.1.10)

Die erfolgreiche Klonierung spezifischer PCR Fragmente in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor wurde anschließend mittels PCR (siehe Kapitel 2.1.3) bzw. durch Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.1.1.6) nach Minipräparation (siehe Kapitel 2.1.1.2) überprüft. Um den unspezifischen Einbau von DNA-Mutationen aus der PCR-Reaktion auszuschließen wurden die klonierten Fragmente anschließend mit Hilfe von Standardprimern von beiden Seiten sequenziert (siehe Kapitel 2.1.1.13).

2.1.7 Herstellen von Gesamtzell-Proteinextrakten

2.1.7.1 Herstellen von denaturierten SDS Extrakten

Denaturierte Gesamtzell-Proteinextrakte für die Western Blot Analyse (siehe Kapitel 2.1.11) wurden durch direkte Lyse der Zellen in 2 x SDS Probenpuffer (je nach Größe der Kulturschalen und Anzahl der Zellen ca. 200 - 800 µl) hergestellt. Die Zellen wurden dazu kurz mit PBS gewaschen, danach ca. 5 - 10 min bei RT mit 2 x SDS-Probenpuffer (+125 U / ml Benzonase) inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgeschabt. Das Lysat wurde dann 5 min bei 95 °C denaturiert und der Überstand für 5 min abzentrifugiert (13000 UpM; RT). Für die Western Blot Analyse (siehe Kapitel 2.1.11) wurden bis zu 60 µl (Minigele) bzw. bis zu 150 µl Lysat für große Gele in der SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.10) eingesetzt.

Sollten Extrakte gegebenenfalls auch für Immunpräzipitationen (IP) (siehe Kapitel 2.1.9) verwendet werden, wurden sogenannte verdünnte SDS-Extrakte hergestellt. Dazu wurden die Zellen in einem verdünnten SDS-Lysis Puffer (bestehend aus: Lysis Puffer I + II im Verhältnis 1:2; +5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; + 0,5 x Pic; + 125 U / ml Benzonase) für 10 min lysiert, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 95 °C Hitze denaturiert. Die Überstände wurden dann für 10 min bei 13000 UpM (RT) abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.7.2 Herstellen von nativen RIPA-Extrakten

Zur Herstellung von nativen Proteinextrakten wurden die Zellen (je nach Größe der Schalen und Anzahl der Zellen) in ca. 200 - 800 µl 1 x RIPA-Puffer (+5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; + 0,5 x Pic; + 125 U / ml Benzonase) lysiert. Dazu wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 1 x RIPA inkubiert und anschließend abgeschabt. Nach zwei weitere Inkubationen von 10 min bei RT und 10 min auf Eis wurden die Überstände für 10 min bei 14000 UpM (4 °C) abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.8 Proteinbestimmung von Gesamtzell-Proteinextrakten

Die Proteinbestimmung von Zellextrakten erfolgte mit Hilfe des BCA™ Protein Assay Kit der Firma Pierce (USA) nach Herstellerangaben. Die Quantifizierung der Proteinmenge einer Lösung mit Hilfe des BCA-Tests (Smith *et al.*, 1985) liegt die Biuret-Reaktion zu Grunde, welche die Komplexbildung von Protein mit Cu²⁺-Ionen unter alkalischen Bedingungen bezeichnet. Cu²⁺-Ionen werden dabei reduziert und bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, dessen Farbintensität bei 562 nm photometrisch bestimmt wird.

Zur Herstellung des „*Working Reagent*“ wurden pro Probe 490 µl Reagenz A mit 10 µl Reagenz B versetzt. Zur Herstellung des „*Working Reconstitution Buffers*“ (WRB) wurden pro Probe 6,25 µl A. a. i. mit 6,25 µl „*Reconstitution Buffer*“ gemischt. Zu 12,5 µl der Probe wurden nun 12,5 µl WRB und 500µl WR pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Nach dem Abkühlen der Proben für 5 - 10 min wurde die Absorption am NanoDrop (PepLab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt.

Um Proteinextrakte zu quantifizieren, bei deren Herstellung Lysepuffer mit

zusätzlichem Reduktionsmittel (z. B. DTT) verwendet wurde, musste das dem Kit beiliegende Reduktionsmittel-Kompatibilitätsreagenz verwendet werden. Zur Herstellung der Kompatibilitätsreagenz-Stocklösung wurden 20 mg Kompatibilitätsreagenz in 1 ml WBR gelöst.

Anschließend wurden 12,5 µl Proteinextrakt mit 12,5 µl der Stocklösung gut gemischt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl WR folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 30 min. Nach dem Abkühlen der Proben konnte dann die Absorption gemessen werden.

Die Proteinkonzentration der Probe wurde anhand einer zuvor erstellten BSA-Standardkurve ermittelt.

2.1.9 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) lassen sich Proteine durch die Kopplung von Antigen-Antikörper-Komplexen an Protein A/G-Agarose präzipitieren und so spezifisch aus einem Proteingemisch isolieren. Dabei binden Antikörper über ihre Fc-Domäne reversibel an Protein A und Protein G, welche sich in ihrer Spezifität für verschiedene Immunglobuline unterscheiden.

Für die Immunpräzipitationen wurden je Ansatz 100 - 150 µl RIPA Zellextrakt (siehe Kapitel 2.1.7.2) eingesetzt. Um unspezifisch an die A/G-Plus Agarose bindende Proteine aus dem Extrakt zu entfernen („*preclearing*“), wurde dieser zunächst für 3 - 4 h mit 20 µl äquilibrierter Protein A/G-Plus Agarose (Santa Cruz, Heidelberg) bei 4 °C auf einem Überkopffrotierer inkubiert. Anschließend wurde die A/G-Plus Agarose mittels Zentrifugation (14000 UpM; 4 °C; 5 min) entfernt. Die Präzipitation der Zielproteine aus dem Überstand erfolgte durch Zugabe von 1 µg spezifischen Antikörpers über Nacht (4 °C; Überkopffrotierer). Parallel dazu erfolgte das Absättigen von Bindestellen („*blocking*“) der für die spätere Antikörperbindung benötigten, zuvor äquilibrierten, A/G-Plus Agarose mit 50 µg BSA / ml (4 °C; Überkopffrotierer). Am nächsten Tag wurde die geblockte Agarose zunächst dreimal mit RIPA Puffer gewaschen (je 300 µl; 1 min; 13000 UpM) und anschließend jeweils 30 - 40 µl der A/G-Plus Agarose den Zellextrakten zugefügt. Die Bindung der Antigen-Antikörper Komplexe an die A/G-Plus Agarose erfolgte bei 4 °C auf dem Überkopffrotierer. Nach 4 - 6 h wurden die an die Agarose gebundenen Komplexe dreimal mit RIPA Puffer gewaschen (je 300 µl RIPA; 1 min; 13000 UpM) und anschließend, nach Zugabe von 50 µl 2 x SDS

Probenpuffer, für 5 min bei 95 °C denaturiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (5 min; 13000 UpM) wurde die Agarose präzipitiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Analyse der Immunpräzipitate erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (siehe Kapitel 2.1.11). Radioaktive Präzipitate (siehe Kapitel 2.5) wurden ebenfalls mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele anschließend auf Whatman-Papier getrocknet (60 -120 min, 80 °C; Vakuum Gel Trockner Biorad, München) Die Visualisierung der radioaktiven Signale erfolgte durch direkte Exposition eines Phosphoimagers (Raytest, Staubenhardt) bei RT bzw. eines Röntgenfilms (Fuji, Düsseldorf) in einer Filmkassette für 20 h bis zu 7 Tagen bei -80 °C. Die Quantifizierung der Phosphoimagerexposition (PSL = *photo-stimulated luminescence*) erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware „*Image Gauge 3.01*“ der Firma Fuji (Düsseldorf).

2.1.10 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Proteine werden dabei durch das negativ geladenen Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) denaturiert sowie deren Eigenladung maskiert, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit nur noch von dem Molekulargewicht der Proteine abhängt.

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte in Anlehnung an das Protokoll nach Lämmli (Laemmli, 1970) in einer diskontinuierlichen, horizontalen Gelelektrophorese. Dabei werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6,8; 4 % Acrylamid) in einer Laufront vereinigt, und anschließend im Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8,8; 10 - 15 % Acrylamid) separiert. Die Prozentigkeit des Trenngels hängt dabei von dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine ab. Für Proteine im Bereich von 20 kDa wurden 15 % SDS-Gele verwendet, Proteine im Bereich von 40 - 60 kDa wurden in 12,5 % Gelen separiert. Proteine mit größeren Molekulargewichten wurden entsprechend in geringer konzentrierten SDS-Gelen (10 %) aufgetrennt.

Für die Herstellung der SDS-Gele wurde zunächst die Trenngellösung vorbereitet und durch Zugabe von 10 µl / ml einer 10-%igen APS-Lösung (Amoniumpersulfat = Radikalbildner) sowie 1 µl / ml TEMED-Lösung (Tetramethylethylethylendiamin = Katalysator) zwischen zwei horizontalen Glasplatten

auspolymerisiert. Anschließend wurde darauf das Sammelgel gegossen, indem zuvor ebenfalls die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von APS und TEMED induziert wurde.

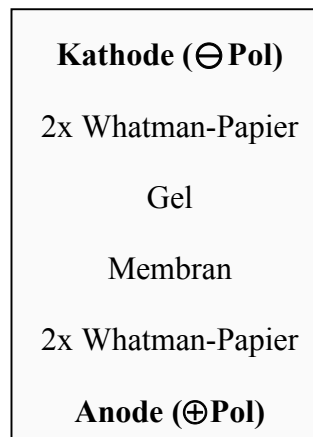
Jeweils gleiche Mengen der aufzutrennenden Proteinproben wurden mit 1 / 5 des 5 x SDS-Probenpuffers versetzt und zur vollständigen Denaturierung 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine für 1,5 - 2h bei 80 - 140 V in SDS-Laufpuffer auf Minigelen (Trenngel: 6 x 8,5 cm), bzw. bei 15 mA auf großen Gelen (Trenngel: 11 x 18 cm) über Nacht. Zur späteren Abschätzung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wurde in mindestens einer Bahn ein angefärbter Protein Standard („*Prestained Protein Ladder*“ ; Fermentas, St. Leon-Rot) mit aufgetrennt. Die so separierten Proteine wurden anschließend zur weiteren Analyse auf eine Membran (Nitrozellulose bzw. PVDF) übertragen (siehe Kapitel 2.1.11.1) oder, insofern es sich um radioaktive Proben (siehe Kapitel 2.5) handelte, die Gele auf Whatman Papier im Gelrockner getrocknet (siehe Kapitel 2.1.9).

2.1.11 Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse werden die zuvor über eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteinextrakte (siehe Kapitel 2.1.10) mittels Elektro-Transfer (Semi-Dry Verfahren; (Kyhse-Andersen, 1984) aus dem SDS-Gel auf eine Membran (Nitrozellulose bzw. PVDF) übertragen. Die so auf der Membran immobilisierten Proteine können anschließend durch spezifische Antikörper in einer indirekten, immunologisch-enzymatischen Nachweisreaktion sichtbar gemacht werden.

2.1.11.1 Elektro-Transfer

Vor dem Elektro-Transfer wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden 4 Whatman-Papiere und die zu verwendende Membran (Nitrozellulose bzw. PVDF = Polyynylidendifluorid) auf Größe des Trenngels zugeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Wurde PVDF-Membran verwendet, wurde diese zunächst mit Methanol benetzt und danach äquilibriert. Der Elektro-Blot wurde anschließend, wie nachfolgend dargestellt, luftblasenfrei zusammengesetzt:



Durch die angelegte Spannung (Minigele: 10 V, 25 - 45 min; Große Gele: 260 mA, 45 - 90 min) wandern die durch das SDS negativ maskierten Proteine Richtung Anode und binden an die Membran. Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers sowie der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Gelbahnen wurde die Membran nach dem Transfer kurz in TBS gewaschen und anschließend mit Ponceau S Lösung für 5 min bei RT auf einer Wippe inkubiert. Das rote Ponceau S bindet reversibel an alle gebundenen Proteine und macht diese sichtbar. Anschließend wurde die Färbung von der Membran durch mehrmaliges Waschen mit TBS wieder entfernt.

2.1.11.2 Immunoblot

Die auf der Membran immobilisierten Proteine können anschließend mittels spezifischer Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Dazu wurden zunächst alle freien Bindestellen der Membran durch eine 1 - 2stündige Inkubation mit Blockinglösung (5 % (v / v) BSA bzw. Magermilchpulver (MP)) abgesättigt. In einem zweiten Schritt erfolgte dann die spezifische Bindung des Erstantikörpers an sein Antigen über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS (je 5 min, RT) erfolgte die Inkubation mit einem Spezies-spezifischen, HRP-gekoppelten („*Horseradish Peroxidase*“) Zweitantikörper für 1 - 2 h bei RT. Der Nachweis des spezifischen Proteins beruht auf der Oxidation von Luminol durch die an den Zweitantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase. Bei dieser Reaktion kommt es zur Emittierung von Lichtquanten (Chemolumineszenz), die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden können. Dazu wurde die Membran dreimal mit TBS gewaschen (5 min, RT) und danach mit einer selbst angesetzten bzw. einer kommerziell erhältlichen Chemolumineszenz-Lösung (LumiGLO®, Cell Signaling (USA); bei

schwachen CL-Signalen) für 1 min im Dunklen inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis durch Exposition eines Röntgenfilms in einer Filmkassette, je nach Stärke der Signale, für 2 sec bis 30 min.

Die im Rahmen dieser Dissertation für die Western-Blot Analyse verwendeten Erst- und Zweitantikörperverdünnungen sind in nachfolgender Übersicht dargestellt:

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Pufferlösung</i>
anti-mAktin (Maus, monoklonal)	1:10000	5 % Milchpulver in TBS
anti-mFabp5 (Ziege, polyklonal)	1:2000	5 % Milchpulver in TBS
anti-Flag M2 (Maus, monoklonal)	1:4000	5 % Milchpulver in TBS
anti-mPPAR β (Ziege, polyklonal)	1:3000	5 % Milchpulver in TBS
anti-hRXR α (Kaninchen, polyklonal)	1:2000	5 % Milchpulver in PBS
Esel-anti-Ziege, HRP-gekoppelt	1:3000	5 % Milchpulver in TBS
Kaninchen-anti-Ziege, HRP-gekoppelt	1:3000	5 % Milchpulver in TBS
Ziege-anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:3000	5 % Milchpulver in TBS
Ziege-anti-Maus, HRP-gekoppelt	1:3000	5 % Milchpulver in TBS

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellbiologische Standardmethoden

2.2.1.1 Verwendete Zellkulturen und Kulturbedingungen

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank in einem Labor der Sicherheitsstufe S2. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde ausschließlich mit autoklavierten, sterilisierten oder steril filtrierten Materialien und Lösungen gearbeitet.

<i>Zelllinie</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Medium</i>
NIH3T3	murine Fibroblastenzelllinie	D. Lowy NIH, Bethesda	Standard-DMEM
Flox1	murine Fibroblastenzelllinie	J. Adamkiewicz, IMT, Marburg	Standard-DMEM
A1 <i>Pparb</i> ^{-/-}	murine Fibroblastenzelllinie	J. Adamkiewicz, IMT, Marburg	Standard-DMEM
Phoenix-eco (Phi Nx)	Verpackungszelllinie (modifizierte HEK293)	„Nolan Labor“ (ATCC SD-3444)	Standard-DMEM
A1 <i>Pparb</i> ^{-/-} pLPCX #L2	murine Fibroblastenzelllinie	M. Rieck IMT, Marburg	Standard-DMEM + 2 µg /ml Puromycin
A1 <i>Pparb</i> ^{-/-} 3xFlag-PPARb Klon #1 und #3	murine Fibroblastenzelllinie	M. Rieck IMT, Marburg	Standard-DMEM + 2 µg /ml Puromycin
MoMuLV	murine, Helfervirus- produzierende Zellen	M. Wanzel IMT, Marburg	Standard-DMEM
3Fb-p „producer cell line“	murine Fibroblastenzelllinie	M. Rieck IMT, Marburg	Standard-DMEM
3Fb-np „non-producer cell line“	murine Fibroblastenzelllinie	M. Rieck IMT, Marburg	Standard-DMEM
Lpcx-p „control producer cell line“	murine Fibroblastenzelllinie	M. Rieck IMT, Marburg	Standard-DMEM
HaCaT	humane Keratinocytenzelllinie	P. Boukamp DKFZ, Heidelberg	Standard-DMEM
HEK293 „Human Embryonic Kidney“	humane embryonale Nierenepithelzelllinie	ATCC, CRL-1573	Standard-DMEM

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Zellen in Standard-DMEM Medium D₁₀ („*Dulbeccos modified eagle medium – with Glutamin and high glucose*“) mit 10 % (v / v) FCS und 1 % (v / v) Penicillin (10.000 Units / ml)/Streptomycin (10 mg / ml) kultiviert (siehe Kapitel 2.2.1.3).

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen

Zellen, die für längere Zeit gelagert werden sollten, wurden zunächst mit PBS gewaschen, anschließend trypsiniert (37 °C, 2 - 3 min) und dann in Standardmedium aufgenommen. Die Zellen wurden danach 5 min bei 1000 UpM abzentrifugiert und das Pellet in Einfriermedium (Standardmedium D₁₀ + 15 % zusätzliches FCS + 7,5 % DMSO) gelöst. Jeweils 1 ml Zellsuspension wurde anschließend in 1 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Zum schonenderen Einfrieren der Zellen und zur Vermeidung von Kristallisationschäden wurden die Zellen in eine spezielle Einfrierbox (Nalgene, Belgien) gestellt und für 4 - 24 h bei -80 °C eingefroren. Anschließend erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff zur Kryokonservierung.

Zum Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden Aliquots zunächst für 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend in 10 cm Zellkulturschalen mit 8 ml Standardmedium überführt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit frischem Standardmedium versorgt und bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C, 5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre weiter kultiviert.

2.2.1.3 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Zellen wurden standardmäßig in 10 cm Kulturschalen mit Standard-DMEM-Medium (D₁₀) kultiviert. Die Anzucht erfolgte in einem CO₂-begasten Brutschrank (5 % CO₂) mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit bei 37 °C. Alle 3 - 4 Tage (ca. 80 -90 % Konfluenz) wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde zunächst das alte Medium entfernt und die Zellen kurz mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA Lösung für 3 - 10 min inkubiert, vorsichtig von den Kulturschalen abgelöst und ordentlich resuspendiert. Für die weitere Kultur wurde je nach Zelllinie ca. 1/3 bis 1/20 der Zellen auf eine neue 10 cm Schalen ausplattiert.

2.2.1.4 Zählen von Zellen

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl bei Wachstumskurven (siehe Kapitel 2.8), bzw. zur Ausplattierung einer definierten Zellmenge, wurden die Zellen einer oder mehrerer Kulturschalen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) ausgezählt.

Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA von den Kulturschalen abgelöst und gegebenenfalls gepoolt. Die Zellsuspension wurde

dann mit D₁₀ Medium verdünnt (je nach Zelltyp und Zelldichte 1 : 3 - 1 : 10), gut durchmischt und anschließend in der Neubauer Zählkammer quantifiziert. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen von 4 Großquadraten} \times 10.000}{4}$$

4

Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wurde die Zellzahl pro Milliliter lediglich mit dem Gesamtlösungsvolumen der Zellsuspension multipliziert. Standardmäßig wurden zweimal 4 Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl aus dem Durchschnitt der Einzelzählungen ermittelt.

2.2.1.5 Mycoplasmentest mittels Hoechst DNA-Fluoreszenzfärbung

Die Überprüfung der in Kultur befindlichen Zellkulturen auf bakterielle Mycoplasmenkontamination erfolgte in regelmäßigen zeitlichen Abständen mittels Fluoreszenz-DNA-Färbung. Der in doppelsträngige-DNA interkalierende Farbstoff Hoechst 33258 (Invitrogen, Karlsruhe) färbt neben der zelleigenen DNA auch die DNA der sich im Zytoplasma befindlichen Mycoplasmenbakterien, die somit im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden.

Zu untersuchende Zellkulturen wurden über Nacht in 3 cm Kulturschalen auf Deckgläschen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden diese für 1 h in 70 % Ethanol fixiert, danach 2 x 5 min in PBS gewaschen und anschließend für 5 min in einer Lösung von PBS/Hoechst 33258 (0,4 µg / ml) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in PBS (je 5 min) wurden die Deckgläschen kurz in A. a. i. gespült und dann mit einem Tropfen Mowiol®4-88 (Calbiochem; Merck, Darmstadt) auf einem Objektträger eingedeckt. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 350 nm. Positiv getestete Zellen wurden umgehend sachgemäß entsorgt oder die betroffenen Kulturen wurden für 2 - 3 Wochen in Standardmedium mit 2 % Mycokill (PAA, Cölbe) nach Herstellerangaben dekontaminiert. Die erfolgreiche Beseitigung der Mycoplasmenkontamination wurde anschließend erneut mittels Hoechstfärbung überprüft.

2.3 Transfektion

Mittels Transfektion kann Fremd-DNA (z.B. Plasmid-DNA) bzw. -RNA (z.B. siRNA) direkt in Säugerzellen eingebracht werden. Die meisten Transfektionsmethoden beruhen

auf der Bildung von Komplexen oder Präzipitaten aus der negativ geladenen DNA bzw. RNA und einem kationischen Komplexpartner (z.B. Polymere wie PEI oder DEAE-Dextran, Lipide, Dendrimere oder CaCl_2 Ionen). In den meisten Fällen erfolgt dabei die Aufnahme der Komplexe bzw. Präzipitate in das Zytoplasma der Zellen mittels Endozytose.

Um die Ausbeute an Fremd-DNA im Zellkern zu erhöhen ist es wichtig, mit proliferierenden Zellen (40 - 80 % Konfluenz) zu arbeiten, da größere DNA-Fragmente (> 1000 bp) sonst aufgrund der „*Nuclear Barrier*“ nicht in den Kern gelangen.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen transienter und stabiler Transfektion. Während bei der transienten Transfektion die zeitlich begrenzte, zumeist Vektor-basierte Expression von Genen im Vordergrund steht, ist bei der stabilen Transfektion die dauerhafte Expression der Fremd-DNA von der Integration in das Genom der Wirtszelle abhängig. Daher bedient man sich zur dauerhaften Einschleusung von Fremd-DNA ins Wirtsgenom vermehrt viraler Träger- und Integrationssysteme (siehe Kapitel 2.6).

2.3.1 PEI-Transfektion

Die Transfektion von Zellen mit Polyethylenimin (PEI) beruht auf der Komplexbildung der negativ geladenen DNA mit dem kationischen PEI-Polymer. Die Aufnahme der Komplexe ins Zytoplasma erfolgt anschließend via Endozytose.

Für die PEI-Transfektion wurden am Vortag die Zellen so ausplattiert, dass sie zu Beginn der Transfektion idealerweise eine Konfluenz von 60 - 80 % aufwiesen. Kurz vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel auf serumreduziertes DMEM ($\text{DMEM} + 2\% \text{ FCS} = \text{D}_2$), wobei das Volumen, je nach verwendetem *well* bzw. verwendeter Kulturschale, 2 - 8 ml D_2 (s. u.) betrug. Für die Transfektion wurde zunächst eine PEI-PBS-Lösung angesetzt. Dazu wurde die PEI-Stammlösung 1:20 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde eine Lösung aus der zu transfizierenden Plasmid-DNA und PBS angesetzt, wobei auf eine bestimmte DNA-Gesamtmenge aufgefüllt wurde (s. u.). Zu dieser DNA/PBS-Lösung wurde die PEI/PBS-Lösung pipettiert und sofort gründlich gemischt (ca. 5 sec vortexen). Die Komplexbildung erfolgte während einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend wurde die Lösung tropfenweise in das Zellmedium (D_2) gegeben. Ein Mediumwechsel auf normales Standardmedium (D_{10}) erfolgte nach 4-stündiger Inkubation bei 37° .

Zellkultur- schale	Medium pro Schale / well	PEI-PBS- Lösung pro Schale / well	DNA-PBS-Lösung pro Schale / well	PEI-DNA- Lösung pro Schale / well
6'well- Zellkultur- platten	2 ml	5 µl PEI 95 µl PBS	4 µg Reporterplasmid 10 - 50 ng pro Expressionsplasmid ad 5µg Leervektor 100 µl PBS	200 µl
6 cm- Zellkultur- schalen	4 ml	10 µl PEI 190 µl PBS	0,5 - 2 µg pro Expressionsplasmid ad 10 µg Leervektor 200 µl PBS	400 µl
10 cm- Zellkultur- schalen	8 ml	20 µl PEI 380 µl PBS	1 - 4 µg pro Expressionsplasmid ad 20 µg Leervektor 500 µl PBS	800 µl

2.3.2 siRNA-Transfektion

Die siRNA-Technologie hat in den vergangenen Jahren mehr und mehr an Bedeutung gewonnen, bildet sie doch eine gute Alternative zum klassischen Genknockout (z. B. Knockout-Maus). siRNAs sind kleine (19-21bp), doppelsträngige RNA-Moleküle, die nach Inkorporation in den sogenannten RISC Komplex („RNA-induced silencing complex“) an ihre Ziel-mRNA binden und zu deren Degradation oder zur Inhibition ihrer Translation führen. Die siRNA-Technologie eignet sich daher hervorragend zur Analyse von Genfunktionen, da es durch sie möglich ist, die Expression eines Gens zielgerichtet und zeitlich begrenzt auszuschalten.

siRNAs gegen nahezu alle bekannten humanen und murinen Gene sind mittlerweile kommerziell erhältlich und können, vergleichbar den Plasmiden (siehe Kapitel 2.3.1), direkt in die zu untersuchenden Zellen transfiziert werden. Die hier verwendeten siRNAs wurden kommerziell von den Firmen Qiagen (Hilden) und Santa Cruz (Heidelberg) bezogen.

Für die siRNA Transfektion wurden Zellen am Vorabend auf 6 bzw. 10 cm Schalen so in antibiotikafreiem Standardmedium (D₁₀) ausplattiert, dass sie bei der Transfektion eine ungefähre Konfluenz von 40 - 60 % aufwiesen (üblicherweise 3 - 4 x10⁵ Zellen / 6 cm Schale; 5 - 8 x 10⁵ Zellen / 10 cm Schale). Vor der eigentlichen Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel auf D₀-Medium (ohne Serum und Antibiotika). Anschließend wurde zunächst der Transfektionsmix angesetzt. Dazu wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) mit Opti-MEM® Medium (Invitrogen, Karlsruhe) 1 : 50 verdünnt. Parallel dazu wurde auch der siRNA-Mix (aus siRNA und Opti-MEM® Medium s. u.) vorbereitet und beide Ansätze für 5 min bei RT inkubiert. Nach dieser kurzen Inkubation wurden beide Ansätze zusammenpipettiert, gut gemischt (ohne zu vortexen) und anschließend zur Komplexbildung weitere 15 min bei RT inkubiert. Der fertige Transfektionsansatz wurde dann tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese 5 - 6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel auf normales Standardmedium (D₁₀). Ca. 22 - 28 h post Transfektion (p. T.) wurden die Zellen abgelöst, gezählt (siehe Kapitel 2.2.1.4) und für die Isolation von RNA (48 h p. T. => Kontrolle des Knockdowns; siehe Kapitel 2.1.1.3), sowie für eine zweite Runde siRNA Transfektion (72 h p. T.) auf 6 bzw. 10 cm Kulturschalen neu ausplattiert.

Zellkultur- schale	D₀-Medium pro Schale	Transfektionsmix pro Schale	siRNA-Mix pro Schale (20µM)	siRNA- Transfektionsansatz pro Schale
6 cm- Zellkultur- schalen	4 ml	10µl Lipofectamin™ 2000 + 500µl Opti-MEM®	20µl siRNA + 500µl Opti-MEM®	1030µl
10 cm- Zellkultur- schalen	6 ml	25µl Lipofectamin™ 2000 + 1.25ml Opti-MEM®	50µl siRNA + 1,25ml Opti-MEM®	2575µl

48 h p. T. ist der siRNA-vermittelter Genknockdown erfahrungsgemäß am deutlichsten nachweisbar, entsprechend wurde zu diesem Zeitpunkt RNA isoliert (siehe Kapitel 2.1.1.3) und die Qualität des Knockdowns via qPCR (siehe Kapitel 2.1.5) verifiziert. War der Knockdown erfolgreich, wurde 72 h p. T. der Genknockdown nach oben

beschriebenem Protokoll wiederholt. Erneut wurden 24 h p. T. (2) Zellen abgelöst und gezählt und entsprechend dem experimentellen Ansatz für die Ligandenstimulation ausplattiert.

Eine Übersicht der im Rahmen dieser Dissertation verwendeten siRNAs findet sich in Kapitel 2.11.6.

2.3.2.1 Zyklischer *Cdkn1c* siRNA Knockdown

Der Einfluss von PPAR β auf den Zellzyklusinhibitor p57^{KIP2} und damit indirekt auf die Proliferation von *3xFlag-Pparb* Klon #1 Fibroblasten sollte mit Hilfe eines siRNA-vermitteltem Genknockdown untersucht werden. Dazu sollte das Proliferationsdefizit der 3xFLAG-PPAR β positive Zellen, im Mischklons *3xFlag-Pparb* Klon #1 (ca. 30 % FLAG-PPAR β positive Zellen), durch Knockdown des Zellzyklusinhibitors *Cdkn1c* (Protein: p57^{KIP2}) gegenüber den 3xFLAG-PPAR β negativen Zellen ausgeglichen werden. Die daraus folgende höhere Proliferationsrate der 3xFLAG-PPAR β positiven Zellen sollte dadurch deren relativen Anteil im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten bzw. unbehandelten Kontroll-Zellen steigern. Der Nachweis der geringeren Abnahme an 3xFLAG-PPAR β positiven Zellen gegenüber den Kontrollen erfolgte indirekt durch Vergleich der Expressionslevel von (*3xFlag-*) *Pparb* mittels qPCR (siehe Kapitel 2.1.5). Um die Unterschiede deutlich sichtbar zu machen erfolgte eine Kultivierung über mehrere Passagen mit insgesamt drei zyklischen *Cdkn1c* Knockdowns. Alle 72 h erfolgte daher eine Behandlung mit siRNA wie in Kapitel 2.3.2. beschrieben. Zur Überprüfung der Expressionslevel wurde zudem vor der ersten siRNA-Behandlung (T0h), parallel zu den Behandlungen alle 48 h nach siRNA-Transfektion (Überprüfung der Knockdown-Rate) sowie 96 h nach der 3. siRNA-Behandlung (Endpunkt) RNA isoliert und die Expressionslevel mittels qPCR (siehe Kapitel 2.1.5) analysiert. Ein Überblick über den zeitlichen Ablauf des zyklischen *Cdkn1c* siRNA-Experimentes ist in der unten abgebildeten Graphik dargestellt.

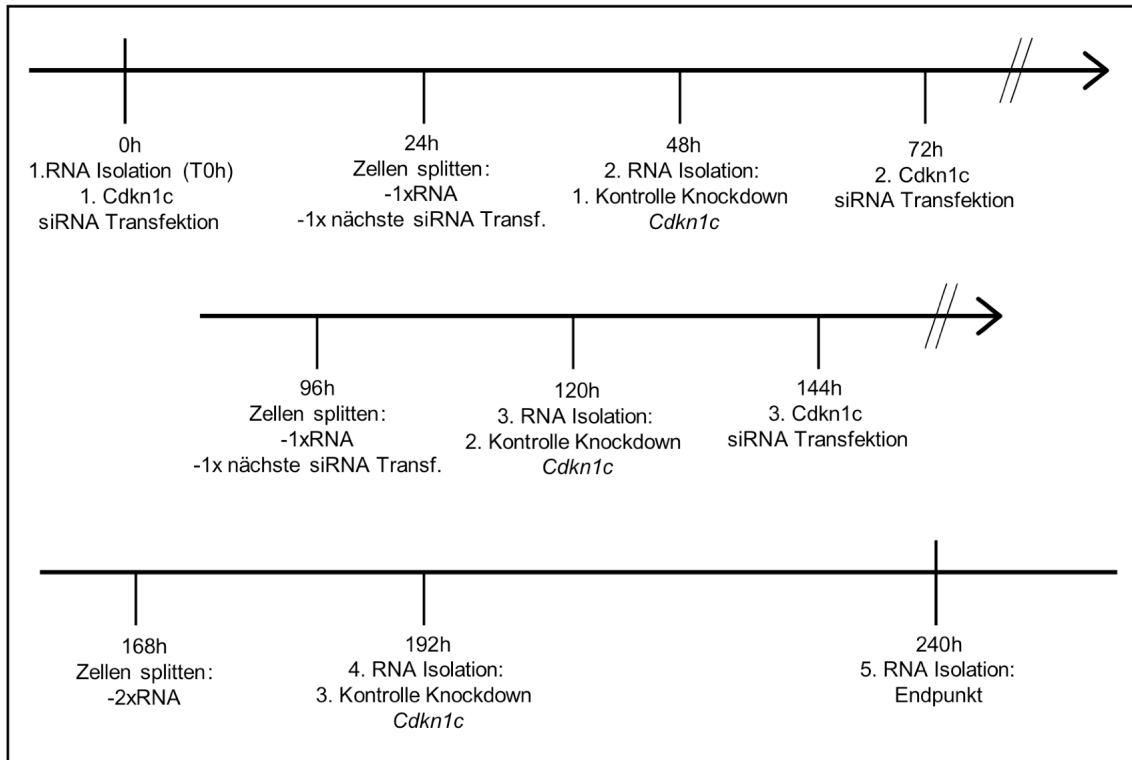


Abb. 2.1: Zeitlicher Ablauf des zyklischen *Cdkn1c* siRNA Knockdowns
Erläuterungen siehe Text.

2.4 Luziferase-Reportergen-Analysen („Luziferaseassays“)

Mit Hilfe von Reportergen-Analysen lassen sich Transaktivierungsstudien *in vitro* in Zellkultur durchführen. Das Luziferase-gekoppelte Reportergensystem beruht auf der Messung von Lichtblitzen (Biolumineszenz), die durch die katalytische Oxidation von D-Luziferin durch das Enzym „Firefly“- Luziferase (aus: *Photinus pyralis*) entstehen. Um die PPAR-abhängige Transaktivierung genauer zu untersuchen wurde im Rahmen dieser Dissertation mit drei unterschiedlichen Reporterkonstrukten (siehe nachfolgende Kapitel 2.4.1 bis 2.4.3) gearbeitet. Dazu wurden 24 - 48 h vor dem *Luziferaseassay* Zellen mit den entsprechenden Reporter- und Expressionsplasmiden in 6'well-Schalen transfiziert (siehe Kapitel 2.3.1) und gegebenenfalls mit Liganden bzw. Inhibitoren behandelt. Für die Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl TGG-Puffer je 6'well für 5 min bei RT lysiert. Um Zelltrümmer vom übrigen Lysat zu entfernen, wurde der Zellüberstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 13000 UpM abzentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl des Lysates zu 360 µl LAB-Puffer („*Luciferase Assay-Buffer*“) in Polystyrolröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Die Messung der

Luziferaseaktivität (RLUs „*relative light units*“) erfolgte nach automatischer Injektion von je 100 µl Luziferinlösung pro Probenröhrchen in einem Luminometer (AutoLumat LB 953 und AutoLumat LB 953Plus; Berthold, Düsseldorf). Gemessen wurde das Integral der Lumineszenz über ein Intervall von 10 ms. Die Messung der Ansätze erfolgte jeweils in Triplikaten, die graphische Auswertung der Messdaten sowie die Berechnung der Standardabweichung wurden mit dem Programm Microsoft Excel (Microsoft, Unterschleißheim) durchgeführt.

2.4.1 LexA-System

Das LexA Protein fungiert ursprünglich als Repressor in Prokaryonten. Mit dem hier verwendeten LexA-System lassen sich vor allem Liganden-abhängige Transaktivierungsstudien durchführen. Das LexA-System besteht aus einem artifiziellen Fusionsprotein bestehend aus der murinen PPAR β -Ligandenbindungsdomäne (PPAR β -LBD), welche N-terminal an die DNA-Bindedomäne (DBD) des bakteriellen LexA Proteins gekoppelt ist. Die LexA-DBD erkennt spezifische Bindestellen, deren Sequenz in eukaryotischen Genomen regulär nicht vorkommen. Sieben dieser DNA-Bindestellen finden sich in einem artifiziellen Reporterkonstrukt vor einen Minimalpromotor (TATAi = TATA-initiator), der die Transkription des Luziferasegens reguliert.

Durch die Fusion mit der PPAR β -LBD kann, unabhängig von der PPAR β :RXR spezifischen DNA-Bindung, das Transaktivierungsverhalten nach Stimulation mit Agonisten bzw. Antagonisten charakterisiert werden. Die Transfektion des Expressionsplasmids pcDNA-LexA-Pparb-LBD und des Reporterkonstrukts 7L-TATAi-pGL3 erfolgte nach oben beschriebenem Protokoll (siehe Kapitel 2.3.1). Die Liganden Behandlung erfolgte für 22 - 48 h.

2.4.2 Gal4-System

Bei dem hier verwendeten Gal4-System handelt es sich ebenfalls um ein Testsystem für Liganden-abhängige Transaktivierung, analog dem LexA-System. Das ursprüngliche Gal4-System stammt aus der Hefe, dort reguliert es als transkriptioneller Aktivator Gene, die beim Galaktoseabbau eine Rolle spielen. Dabei erkennt die Gal4-DBD spezifische Bindesequenzen (UAS-Gal4 DNA-Bindesites, UAS = „*upstream activating sequence*“) im Promotorbereich der Zielgene.

Analog dem LexA-System arbeitet auch das hier verwendete Gal4-System mit einem Fusionsprotein aus PPAR β -LBD und Gal4-DBD. Dieses Fusionsprotein kann nach Transfektion des Expressionsplasmids (pCMX-Gal-Pparb-LBD) an den Promotor des artifiziellen Reporterkonstruktes (10xGal-SV-GL3) binden, und dadurch die Expression des Luziferasegens regulieren. Das Reporterkonstrukt besteht aus zehn UAS-Gal4-DNA-Bindestellen vor einem viralen SV40 Promotor, der dem Luziferasegen vorgeschaltet ist. Neben dem Gal-Pparb-LBD Konstrukt standen ebenfalls die Expressionsvektoren für die PPAR α und γ -LBD (pCMX-Gal-Ppara bzw. g) zur Verfügung.

Die Transfektion der Expressions- und Reporterplasmide (siehe Kapitel 2.3.1), sowie die Ligandenbehandlung, erfolgte analog dem LexA-System.

2.4.3 PPRE-System

Im Gegensatz zu den artifiziellen LexA- und Gal4-Systemen handelt es sich beim PPRE-System um eine nur geringfügig modifizierte Nachahmung der natürlichen PPAR:RXR Genregulation (siehe Kapitel 1.2.4.1). Das Reporterplasmid 3xPPRE-TATAi-pGL3 besteht aus drei repetitiven PPRE Sequenzen, die vor einen TATAi Minimalpromotor geschaltet sind und so die Expression der Luziferase regulieren können. Die verstärkte Aktivierung der Transkription des Luziferasegens setzt die Bindung von PPAR:RXR Heterodimeren an die PPRE Sequenzen voraus. Eine weitere Verstärkung der Transkription erfolgt durch PPAR- bzw. RXR-spezifische Ligandenbindung. Neben der Transfektion des Reporterkonstruktes wurden parallel dazu PPAR β (pCMX-mPPAR β) und RXR α (pSG5-hRXR α) überexprimiert.

Die Transfektion der Expressions- und Reporterplasmide (siehe Kapitel 2.3.1) sowie die Ligandenbehandlung, erfolgte analog dem LexA-System.

2.5 „Pulse-Chase“ Experimente

Die Halbwertszeit von Proteinen in der Zelle ist sehr unterschiedlich. Sie reicht von wenigen Minuten bis hin zu mehreren Tagen und Monaten (z. B. Strukturproteine) und kann, abhängig von den physiologischen Gegebenheiten, zusätzlich variieren. Zur Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen eignen sich sogenannte „Pulse-Chase“

Studien. Dabei werden Zellen zunächst auf Methionin- (Met) und Cystein- (Cys) freiem Medium gehungert. Anschließend erfolgt eine *in vivo* Markierung aller neu gebildeten Proteine durch die Inkubation der Zellen mit Medium, welches, neben allen sonstigen Bestandteilen, ausschließlich radioaktiv markiertes L-[³⁵S]-Methionin und L-[³⁵S]-Cystein enthält (→ „Pulse“). Nach 30 - 120 Minuten wird dieses dann durch normales Standardmedium ersetzt und es beginnt die Abklingphase (→ „Chase“), in der, durch die proteosomale Degradation, die radioaktiv markierten Proteine abgebaut und die radioaktiv markierten Aminosäuren wieder freigesetzt werden. Um eine Kinetik für die Bestimmung der Halbwertszeit des murinen PPAR β Proteins zu erstellen, wurden Zellen nach dem „Pulse“ zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert und Proteinextrakte hergestellt. Aus diesen Extrakten wurde dann das PPAR β Protein mittels Immunpräzipitation (siehe Kapitel 2.1.9) isoliert, in einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels wurde das [³⁵S] markierte Protein mit Hilfe eines Phosphorimagers (Raytest, Staubenhardt) bzw. Röntgenfilms (Fuji, Düsseldorf) sichtbar gemacht.

Es wurden unterschiedliche Kinetiken (12 - 48 h) erstellt, zum einen in den 3xFlag-Pparb#1 und NIH3T3 Zellen, zum anderen nach Überexpression von murinem PPAR β und 3xFLAG-PPAR β in NIH3T3 bzw. HEK293 Zellen. Die Durchführung der „Pulse-Chase“ Experimente erfolgte in Anlehnung an das Tansey Labor Protokoll (<http://tanseylab.cshl.edu/protocols.html>). Für die Überexpression wurden die Zellen (NIH3T3 bzw. HEK293) so auf 6 cm Schalen ausplattiert, dass sie bei der Transfektion ca. 60 - 80 % konfluent waren. Es folgte die Transfektion der Zellen wie unter 2.3.1 beschrieben. Je nach experimentellem Ansatz wurden die Zellen dann mit, bzw. ohne Ligand stimuliert. Für die Kinetiken ohne vorherige Überexpression wurden die Zellen so ausplattiert, dass sie eine ca. 80-%ige Konfluenz aufwiesen. Eine eventuelle Ligandenstimulation erfolgte direkt bei der Aussaat. Circa 16 - 20 h post Transfektion, bzw. nach dem Plattieren, wurden die Zellen dann für 30 - 45 min in Serum-reduziertem, Met-/Cys-freiem D₅-Medium (DMEM mit Glutamin, 5 % dialysiertes FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) gehungert. Es folgte ein 30 - 120-minütiger „Pulse“ in D₅-Medium mit 14,3 μ Ci / μ l Redivue™ PRO-MIX™ L-[³⁵S] Met/Cys (Amersham Bioscience, Feiburg). Um eine Kontamination mit gasförmigem, radioaktivem ³⁵Schwefel zu vermeiden, wurden die Schalen sowohl beim „Pulse“ als auch beim „Chase“ auf einem „Aktivkohlebett“ im Brutschrank inkubiert. Nach dem „Pulse“

erfolgte ein kurzer Waschschrift mit kaltem PBS, danach wurden die Zellen mit normalem Standardmedium, entsprechend der „Chase“-Kinetik, weiter inkubiert. Vor der Zellernte wurden diese erneut mit PBS gewaschen und anschließend in 0,5 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers von den 6 cm Schalen abgekratzt. Durch einen 1-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 UpM wurden die Zellen pelletiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Zelllyse wurde das Zellpellet in ca. 200 - 400 µl 1 x RIPA-Puffer (+ 5 mM DTT; + 0,2 mM PMSF; + 0,5 x Pic; + 125 U / ml Benzonase) resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Überstände 10 min bei 14000 UpM (4 °C) abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Durchführung der Immunpräzipitation erfolgte wie unter 2.1.9 beschrieben.

2.6 Retrovirale Infektion von Zellen (Transduktion)

Durch die retrovirale Infektion von Zellen können diese stabil transduziert werden. Retroviren sind RNA-Viren, die nach erfolgter Infektion der Zelle ihr retrovirales Genom mittels Reverser Transkriptase in DNA umschreiben und anschließend ins Wirtsgenom stabil integrieren (als sog. „Provirus“). Diese stabile Integration ist ein entscheidender Vorteil des retroviralen Gentransfers gegenüber den Transfektions-basierenden Methoden. Grundsätzlich unterscheidet man ekotrophe und amphotrophe Retroviren, wobei ekotrophe Viren nur Nagerzellen infizieren, während amphotrophe Viren auch nicht-Nagerzellen infizieren können.

2.6.1 Herstellen von infektiösen Retroviren

Die Herstellung infektiöser ekotropher Retroviren erfolgt durch Calciumphosphat-Transfektion von retroviralen Vektoren in so genannte Verpackungszelllinien. Diese Verpackungslinien exprimieren stabil die viralen Gene *gag*, *pol* und *env*, die später für die Verpackung der infektiösen Viren, die Umschreibung des viralen Genoms und dessen Integration ins Wirtsgenom benötigt werden.

Auf dem retroviralen Vektor wird die Expression des zu transduzierenden Gens zusammen mit einem Resistenzgen (zur Selektion gegen Puromycin) durch die viralen LTRs („*long terminal repeats*“) kontrolliert. Innerhalb des viralen Leserahmens

befindet sich zudem ein so genanntes Ψ -Signal, welches als Verpackungssignal bei der Virusassemblierung dient. Da der virale Leserahmen nicht selbst für die Gene *gag*, *pol* und *env* codiert, sind die mit Hilfe der Verpackungslinie entstandenen Viren zwar infektiös, jedoch replikationsinkompetent.

Als Verpackungszelllinie dienten ekotrophe Phoenix Zellen (Phoenix-eco; dankend erhalten von Dr. Ursula Eilers). Diese wurden so auf 10 cm Schalen ausplattiert, dass sie für die Transfektion eine optimale Konfluenz von 70 - 80 % besaßen. Da mitotische Zellen die DNA-Komplexe besonders gut aufnehmen, wurden die Zellen vor der Transfektion zunächst nochmal für 2 - 3 h mit frischem D₁₀ Standardmedium inkubiert. Anschließend wurden der Transfektionsmix, bestehend aus retroviralem Plasmid, CaCl₂-Lösung und Wasser wie folgt angesetzt.

30 µg retroviraler Vektor ad 1314 µl A. a. i. + 186 µl 2M CaCl ₂

Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden dann Luftblasen in 1500 µl einer HBS-Lösung (*Hepes-buffered saline*) erzeugt („blubbern“) und gleichzeitig der Transfektionsmix zugeführt. Eine 15-minütige Inkubationsphase diente zur Ausbildung der Transfektionskomplexe, die im Anschluss auf die Phoenixzellen gegeben wurden. Die Zellen wurden dann für 24 h im Brutschrank inkubiert, es folgte ein Mediumwechsel auf 7 ml Standardmedium und eine weitere Inkubation für 24 h. Danach wurden die viralen Medienüberstände abgenommen, abzentrifugiert (1000 UpM 5 min), in frische 15 ml Röhren überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Abnahme viraler Überstände konnte nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation wiederholt werden (2. Abnahme). Bis zur endgültigen Verwendung wurden die viralen Medienüberstände bei -80 °C gelagert. Die retroviralen Überstände wurden dankend von Margitta Alt bzw. Kerstin Kaddatz erhalten.

2.6.2 Retrovirale Transduktion von Zellen ohne Selektion

Zur Herstellung transgener Zellen wurden diese mit Retroviren transduziert. Da Retroviren nur mitotische Zellen infizieren, wurden die Zellen so auf 10 cm Schalen ausplattiert, dass sie zum Zeitpunkt der Infektion ca. 30 - 50 % konfluent waren. Zu

Beginn der Infektion wurde das alte Standardmedium entfernt und durch 3 ml viralen Medienüberstand mit 8 μg / ml Polybren (ein Polykation) ersetzt. Es folgte eine Inkubationsphase von 3 h bei 37 °C, anschließend wurden 2 ml frisches D₁₀-Medium mit 3 ml virenhaltigem Medienüberstand mit 8 μg / ml Polybren versetzt und damit die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Nach einem weiteren Mediumwechsel auf Standardmedium konnten die Zellen dann, je nach experimentellem Ansatz, verwendet werden. Vor den eigentlichen Experimenten erfolgte jedoch noch eine Abschätzung der Infektionsrate, nach 3xFlag-Pparb Infektionen mittels Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 2.9), nach Cre-Infektionen mittels qPCR (siehe Kapitel 2.1.5).

2.6.3 Herstellen von Zelllinien mittels retroviraler Transduktion

Die Herstellung stabiler 3xFlag-Pparb bzw. pLPCX Zelllinien mittels retroviraler Transduktion erfolgte wie oben bereits beschrieben, allerdings wurden dazu die Virenüberstände 1:10 mit D₁₀-Medium vorverdünnt. Infiziert wurden A1 *Pparb*^{-/-} Zellen und ca. 24 h post Infektion erfolgte eine Selektion auf positiv transduzierte Zellen mit Puromycin (2 μg / ml). Als Selektionskontrolle dienten nicht transduzierte Zellen. Nach ca. 5 - 10 Tagen bildeten sich erste Zellklone, welche dann mit einer Pipettenspitze, unter gleichzeitigem Aufsaugen von der Schale gekratzt und auf eine 12'well Schale umgesetzt wurden. Die weitere Anzucht der Klone erfolgte durch Passagieren der Zellen auf 6'well Platten, 6 und 10 cm Schalen unter ständigem Selektionsdruck. Die Charakterisierung der Zellklone in Bezug auf die Stärke und Penetranz der 3xFLAG-PPAR β -Expression erfolgte sowohl durch Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 2.9) und Western Blot Analyse (siehe Kapitel 2.1.11) als auch mittels qPCR (siehe Kapitel 2.1.5)

2.6.4 Herstellen von Virus-produzierenden Zelllinien mit Hilfe von Helferviren

Eine Alternative zur Herstellung von infektiösen Viren durch Transfektion retroviraler Plasmide in Verpackungszelllinien (siehe Kapitel 2.6.1) ist die Infektion bereits transduzierter Zellen mit einem Helfervirus.

Durch die erste Transduktion der Zellen kommt es zur stabilen Integration eines

replikationsinkompetenten Provirus¹ ins Wirtszellgenom. Der Helfervirus (MoMuLV-Virus) ist replikationskompetent, da er neben einem Resistenzgen auch die für die Replikation und Infektiosität benötigten viralen *gag*-, *pol*- und *env*-Gene exprimiert. Werden die Provirus¹-tragenden Zellen in einer zweiten Runde mit dem Helfervirus infiziert, produzieren die Zellen anschließend infektiöse, replikationskompetente Helferviren und infektiöse, replikationsinkompetente Viren auf der Basis des Provirus¹.

Für die Herstellung der Virus produzierenden Zelllinien wurden A1 3xFlag-Pparb#1 und pLPCX#L2 Zellen mit Helferviren nach dem Standardprotokoll infiziert (siehe Kapitel 2.6.2). Um die Virusproduktion der Zellen nach der Helfervirusinfektion zu überprüfen, wurde anschließend der Medienüberstand dieser Zellen dazu verwendet, um wiederum A1 *Pparb*^{-/-} Zellen zu infizieren. Die Infektion dieser Zellen wurde im Anschluss mittels Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 2.9) überprüft. Die so erhaltenen Virus produzierenden Zelllinien wurden für den retroviralen *in vivo rescue* in *Pparb null*-Mäusen eingesetzt (siehe Kapitel 2.7). Als Kontrollzelllinie wurden zudem 3xFlag-Pparb#1 Zellen etabliert, die lediglich mit einem pBabe-puro Leervirus infiziert wurden.

Die Helfervirus produzierenden MoMuL-V-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Michael Wanzel zur Verfügung gestellt.

2.7 Retroviraler *in vivo rescue* des hyperplastischen Phänotyps der *Pparb*^{-/-} Endothelien

Wie u. a. mit Hilfe von Matrigel-Plug Assays (siehe Kapitel 2.10.2) gezeigt werden konnte, zeigen *Pparb*^{-/-} Endothelien unter bestimmten Bedingungen einen hyperplastischen Phänotyp (vgl. (Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007). Zum direkten Nachweis der Korrelation zwischen fehlender PPAR β -Expression und dem hyperplastischen Endothel in Matrigel-Plugs, sollte durch retrovirale *in vivo* Reexpression von PPAR β in den Endothelzellen der Wildtyp Phänotyp wieder hergestellt werden (\rightarrow *rescue*). Dazu wurde Mäusen Matrigel gespritzt (siehe Kapitel

¹ Die Bezeichnung Provirus bezieht sich hier ausschließlich auf die Replikations-inkompetenten Proviren pLPCX und pLPCX-3xFlag-Pparb im Genom der entsprechenden stabilen Zelllinien. Allgemein wird als Provirus die ins Wirtszellgenom integrierte DNA eines Retrovirus bezeichnet, also theoretisch auch die des Helfervirus.

2.10.2), welches neben den angiogenen Wachstumsfaktoren Fibroblastenzellen (1×10^5) enthielten, die entweder infektiöse 3xFlag-Pparb (3Fb-p) oder pLPCX (Lpcx-p) Viren produzierten (siehe Kapitel 2.6.4). Als zusätzliche Negativkontrolle wurden 3xFlag-Pparb#1 Zellen verwendet (3Fb-np), die vorab lediglich mit einem pBabe-puro Leervirus infiziert wurden. Nach drei Tagen wurden die *Plugs* entnommen und die neu gebildeten Gefäße immunhistologisch untersucht (siehe Kapitel 2.10.2).

2.8 Erstellen von Wachstumskurven

Wachstumskurven von Zelllinien wurden durch Auszählung von Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer und anschließender Berechnung der Gesamtzellzahl (siehe Kapitel 2.2.1.4) erstellt.

Dazu wurden die zu vergleichenden Zelllinien von den Kulturschalen mit Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend ausgezählt. Für die Wachstumskurven wurden in der Regel 5×10^4 und / oder $1,5 \times 10^5$ Zellen auf 6'well Platten ausplattiert. Für jeden Zeitpunkt, der später quantifiziert werden sollte (standardmäßig alle 24 h / 4 Tage), wurden jeweils Triplikate ausplattiert. Die graphische Auswertung der Wachstumskurven erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim).

2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Das Expressionsverhalten eines Proteins kann mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen *in situ* analysiert werden. Das zu untersuchende Protein wird dabei durch Bindung eines spezifischen, primären Antikörpers detektiert, welcher anschließend durch einen Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen werden kann. Die Analyse der Proben erfolgt fluoreszenzmikroskopisch. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen das Expressionsverhalten der neu generierten 3xFlag-Pparb Klone (siehe Kapitel 2.6.2; 2.6.3) untersucht und die Stärke, bzw. die Penetranz der 3xFLAG-PPAR β -Expression in den einzelnen Zellklonen abgeschätzt. Dazu wurden zunächst Zellen auf Deckgläschen in 3 cm Schalen bzw. 6'well Platten über Nacht ausplattiert. Am nächsten Tag wurde dann das

Medium entfernt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und anschließend 15 min in 3,7 % (v / v) Formalin/PBS fixiert. Nach zwei 5-minütigen Waschschritten in PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen durch eine Inkubation in 0,2 % (v / v) Triton/PBS (5 min, RT). Die Zellen wurden erneut 2 x mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min in 3 % (w / v) BSA/PBS geblockt. Nach Entfernung der Blockinglösung erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Maus-Anti-FLAG; 1:250 in PBS mit 0,5 % Tween-20 (v / v) und 0,5 % (w / v) BSA) für 1 h bei RT. Vor der Inkubation des Zweitantikörpers wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit dem in PBS/0,5 % Tween-20 (v / v) / 0,5 % BSA (w / v) verdünnten Zweitantikörper (Alexa F488 gekoppelten Anti-Maus-AK; Verdünnung 1 : 1500) inkubiert. Zur eindeutigen Zuordnung der späteren Signale in den Zellen wurde der Zweitantikörperlösung zusätzlich noch der Farbstoff Hoechst 33258 (0,4 µg / ml) beigemischt. Hoechst 33258 ist ein DNA-interkalierender Farbstoff und färbt spezifisch doppelsträngige-DNA (Kernfärbung vgl. Kapitel 2.2.1.5). Es folgten zwei weitere Waschschrritte in PBS, ehe die Deckgläschen nach einem kurzen Spülschritt in A. a. i. mit einem Tropfen Mowiol®4-88 (Calbiochem; Merck, Darmstadt) auf einem Objektträger eingebettet wurden. Die Auswertung der Proben erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm (Alexa F488) und 350 nm (Hoechst 33258).

2.10 Mausezucht und Tierexperimente

Alle Maus-Versuchstiere wurden bei einer Raumtemperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere erhielten Wasser und pelletiertes Futter Altromin 1324 (Altromin, Lage) *ad libidum*.

2.10.1 Injektion subkutaner Tumore

Als Versuchstiere dienten Mäuse eines syngenesischen PPAR β -Mausmodells (Wildtyp oder *Pparb null*) mit genetischem C57bl6 Hintergrund (Peters *et al.*, 2000). Für die Induktion subkutaner Tumore wurden den Tieren 5×10^5 bis 3×10^6 LLC Tumorzellen („*Lewis Lung Cancer*“ Zellen) in 200 µl Zellkulturmedium DMEM subkutan in die seitliche Rückenflanke injiziert.

2.10.2 Matrigel-*Plug* Assays

Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg) besteht aus extrazellulärer Matrix, die durch Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkomzellen gebildet wird. Das Besondere am Matrigel ist seine Eigenschaft bei RT zu einer gelartigen Substanz auszupolymerisieren (Matrigel-*Plug*), wohingegen es bei niedrigen Temperaturen (0 - 4 °C) in flüssigem Zustand vorliegt. Mischt man dem flüssigen Matrigel nun spezielle angiogene Wachstumsfaktoren bei und injiziert dieses dann Mäusen, kommt es durch die Körpertemperatur der Mäuse zur Polymerisation und damit zur Bildung so genannter *Plugs*. Ausgelöst durch die angiogenen Wachstumsfaktoren kommt es zur Neovaskularisierung des Matrigel-*Plugs* durch murine Endothelzellen (Ley *et al.*, 2004).

Für die Matrigel-*Plug* Versuche wurde Mäusen 0,5 ml flüssiges Matrigel (mit 100 nM PGE₂ und 0,6 mg / ml FGF-2) subkutan in die seitliche Rückenflanke injiziert. Nach drei Tagen wurden die Mäuse getötet und die Matrigel-*Plugs* für die weitere Analyse entnommen. Die Charakterisierung der neu gebildeten Endothelien in den Matrigel-*Plugs* erfolgte durch immunhistologische Färbungen von Paraffindünnschnitten. Die Herstellung der Dünnschnitte erfolgte im Labor von Prof. R. Moll (Pathologie, Universität Marburg), die immunhistologischen Färbungen wurden von Dr. M. Kömhoff (Kinderklinik, Universität Marburg) durchgeführt (vgl. Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007).

2.11 Reagenzien und Materialien

2.11.1 Puffer und Lösungen

Standard Puffer und Lösungen:

H ₂ O	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
PBS (<i>Phosphat Buffered Saline</i>)	6.5 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ 2.5 mM KCl 140 mM NaCl pH 7.25; autoklaviert
PBS-T	PBS mit 0,05 % Tween 20
TAE-Puffer (<i>Tris-Acetat-EDTA</i>)	40 mM Tris-Acetat pH 8.0 1 mM EDTA autoklaviert
TBS (<i>Tris Buffered Saline</i>)	50 mM Tris-HCL pH 7,4 150 mM NaCl autoklaviert
TBS-T	TBS mit 0,05 % Tween 20
TE-Puffer (<i>Tris/EDTA</i>)	10 mM Tris-HCL pH 7,4 1 mM EDTA autoklaviert

Spezielle Puffer und Lösungen

all-trans Retinsäure Stammlösung	10 mM in DMSO
APS-Lösung	10-%ig (w / v) in H ₂ O
Arachidonsäure	20 mM in EtOH
β-Cumarsäure Stammlösung	90 mM in DMSO
9-cis Retinsäure Stammlösung	10 mM in DMSO
DTT Stammlösung	1M in H ₂ O
Ethidiumbromid Stammlösung	1-%ige Stocklösung: 10 mg / ml
GW501516 Stammlösung	10 mM in DMSO
Hoechst 33258 Stammlösung	(2 mg / ml)
L165,041	10 mM in DMSO
Luminol Stammlösung	250 mM in DMSO

Luziferin-Stammlösung	1 mM D-Luziferin 25 mM Glycylglycin, pH 7,8 10 mM DTT
NEM Stammlösung	1 M in EtOH
PEI Stammlösung	10-%ig (w / v) in H ₂ O
PIC 50x	1 Tablette in 200 µl H ₂ O
PMSF Stammlösung	200 mM in Isopropanol
Polybren Stammlösung	5 mg / ml in H ₂ O
Rosiglitazone (Avandia)	10 mM in EtOH
SDS-Lösung	10-%ig (w / v) in H ₂ O
TGFβ-2	10 µg / ml in BSA/HCL

Agarose Gelelektrophorese

Agarosegellösung	0,5 - 2 % Agarose (w / v) in 1 x TAE + 0,5 µg / ml Ethidiumbromidlösung (1-%ig)
50 x TAE Laufpuffer	2 M Tris Base 250 mM Essigsäure 50 mM EDTA, pH 8,0
5 x Probenpuffer	50 mM EDTA 50 % (v / v) Glycerin 0,15 % (w / v) Bromphenolblau

5'-DNA Vektor-Dephosphorylierung mit CIP

10 x CIP Puffer	500 mM Tris, pH 8,5 1 mM EDTA
-----------------	----------------------------------

Luziferaseassays

LAB („ <i>Luziferase Assay Buffer</i> “)	25 ml 0,1 M Glycylglycin pH 7,8 (mit 4 M KOH eingestellt) 15 ml 0,1 M KH ₂ PO ₄ , pH 7,8 (mit 4 M KOH eingestellt) 1,5 ml 1 M MgSO ₄ 1,6 ml 0,25 M EGTA, pH 8,0 2 ml 0,1 M ATP 54,9 ml H ₂ O
Luziferinlösung (100 µl je Probe)	20 µl Luziferinstammlösung 25 µl 0,1 M Glycylglycin pH 7,8 (mit 4 M KOH eingestellt) 55 µl H ₂ O
TGG („ <i>Lysis Buffer</i> “)	25 ml 0,1 M Glycylglycin pH 7,8 (mit 4 M KOH eingestellt) 10 ml 10 % Triton-X-100 1,5 ml 1 M MgSO ₄ 1,6 ml 0,25 M EGTA, pH 8,0 61,9 ml H ₂ O

Die fertig angesetzten Puffer (LAB, TGG) wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf RT erwärmt und mit DTT versetzt (Endkonzentration 1 mM).

PEI-Transfektionslösung

450 µl 10-%ige PEI Stammlösung
ad H₂O 50 ml
pH 7 mit 2 N HCl (ca. 150 µl)
steril filtriert

Puffer für Gesamtzell-Proteinextrakte

RIPA („*Radio Immuno Precipitation Assay*“) Puffer

10 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
0,1 % SDS
1 % Igepal (NP-40)
1 % Natriumdesoxycholat

Kurz vor Verwendung hinzugeben:
5 mM DTT

- zum Abbau von Nukleinsäuren:
125 U / ml Puffer Benzonase-Nuklease

- zum Schutz vor Proteasen:
0,2 mM PMSF
0,5 x PIC

SDS-Lyse Puffer (verdünnt):

=> Lyse I und Lyse II im Verhältnis 1:2

Lyse I

150 mM Tris/HCl, pH 6,7
5 % SDS
30 % Glycerol

Lyse II

25 mM Tris/HCl, pH 8,2
50 mM NaCl
0,5 % NP-40
0,1 % SDS
0,1% Na-Azide

Kurz vor Verwendung hinzugeben:
5 mM DTT

- zum Abbau von Nukleinsäuren:
125 U / ml Puffer Benzonase-Nuklease

- zum Schutz vor Proteasen:
0,2 mM PMSF
0,5 x PIC

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

5 x SDS-Laufpuffer

500 mM Tris
1,92 M Glycin
0,5 % SDS

5 x SDS-Probenpuffer

50 mM Tris-HCL, pH6,8
10 % Glycin
1 % SDS
50 mM DTT
0,01 % (w / v) Bromphenolblau

Sammelgellösung	4 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 188 mM Tris-HCl, pH 6,8 Diese Lösung wurde steril filtriert und entgast. Kurz vor Gebrauch hinzugefügt: 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,01 % TEMED
Trenngellösung	10 - 15 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 188 mM Tris-HCl, pH 8,8 Diese Lösung wurde steril filtriert und entgast. Kurz vor Gebrauch hinzugefügt: 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,01 % TEMED

Western Blot

10 x Blot Puffer Semi-Dry (PVDF)	250 mM Tris 1,5 M Glycin
1 x Blot Puffer Semi-Dry (PVDF)	100 ml 10 x Blot Puffer Semi-Dry (PVDF) 100 ml Methanol ad H ₂ O 1L
1x Blot Transfer-Puffer Semi-Dry (Nitrocellulose)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
ECL-Lösung (eigene Herstellung) (Enhanced Chemoluminescence)	0,1 M Tris, pH 8,5 1,25 µM Luminol 200 mM β-Cumarsäure 0,15 % H ₂ O ₂

Transfektion Phoenix Zellen

2 x HBS-Puffer (<i>Hepes Buffered Saline</i>)	280 mM NaCl 50 mM Hepes 1,5 M Na ₂ HPO ₄ pH 7,05 mit NaOH eingestellt steril filtriert
---	--

2.11.2 Bakterien und Zellkulturmedien

Bakterienkultur

LB-Medium („Luria-Broth“ Medium)	1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % NaCl pH 7,5 (eingestellt mit 1N NaOH)
LB-Agar	LB-Medium mit 1 % (w/v) Bacto Agar pH 7,5 (eingestellt mit 1N NaOH)

Selektionsantibiotika

Ampicillin (1000x)	100 mg / ml in H ₂ O
Kanamycin (1000x)	30 mg / ml in H ₂ O

Zellkultur

DMEM mit L-Glutamin „ <i>Dulbeccos modified eagle medium – high glucose</i> “,	PAA, Cölbe
Opti-MEM [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Serum reduziertes Medium mit GlutaMax [™]	
DMEM mit L Glutamin; Methionin- und Cystein-frei	Invitrogen, Karlsruhe
dialysiertes Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Mycokill 50x	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin (100x) (Penicillin 10.000 U / ml; Streptomycin 10 mg / ml)	PAA, Cölbe
Puromycin (20 mg / ml in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe

2.11.3 Kits

ABsolute [™] QPCR SYBR [®] Green Mix (2 x)	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
BCA [™] Protein Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)
BioRad DC Protein Assay	BioRad, München
ImmoMix Red/White (2 x)	Bioline, Offenbach
LumiGLO [®] Reagent (20 x) & Peroxide (20 x)	Cell Signalling, Danvers (USA)
NucleoBond [®] AX100 und Xtra Midi	Macherey&Nagel, Düren
NucleoSpin [®] Extract II („Gel Extraction + DNA clean up“)	Macherey&Nagel, Düren
NucleoSpin [®] RNA II	Macherey&Nagel, Düren
NucleoSpin [®] RNA/Protein	Macherey&Nagel, Düren
Omniscript [®] RT Kit	Qiagen, Hilden
PureLink [™] HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen, Karlsruhe

PureLink™ Gel Extraction Kit

Invitrogen, Karlsruhe

TOPO TA Cloning® Kit (pCR®2.1-TOPO® Vector)

Invitrogen, Karlsruhe

2.11.4 Molekulargewichtsstandards und Nukleotide

Nukleotide

Desoxyribonukleotide (dNTPs)

Invitrogen, Karlsruhe

Molekulargewichtsstandards

Gene Ruler™ „DNA- Ladder Mix“

Fermentas, St. Leon-Rot

Gene Ruler™ „Low Range DNA-Ladder“

Fermentas, St. Leon-Rot

2.11.5 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Auswertungsprogramme

Analyse Software NanoDrop 3.01

Peqlab, Erlangen

Analyse Software Phosphorimager:
„Image Gauge 3.01“

Fuji, Düsseldorf

Lasergene Version 5.52 und darin
enthaltene Analyseprogramme

DNASTAR. Inc
(Madison, USA)

Microsoft Office 2003 (Excel, PowerPoint, Word)

Microsoft (Unterschleißheim)

Mx3000P Betriebs- und Analyse Software
Version 3.20

Stratagene,
Amsterdam (Niederlande)

Tools at NEB („Online sequence analysis tools“)

<http://tools.neb.com/>

Genom- und Protein-Datenbanken

Ensembl Genom Datenbank Projekt
(„The Ensembl genome database project“)

<http://www.ensembl.org/>

„Information hyperlinked over proteins“ (iHOP)

<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>

Jalview
(„A multiple alignment editor written in Java“)

<http://www.jalview.org/>

MAFFT
(Multiple Alignment using East Fourier Transform)

<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>

„National Center for Biotechnology Information“
(NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

UCSC Genome Bioinformatics Site

<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human>

PCR und qPCR Primerdesign

Primer Select (Lasergene Version 5.52)

DNASTAR, Inc (Madison, USA)

Integrated DNA Technologies (Schmidt *et al.*)

<http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx>

Primer Bank (qPCR Primer Database)

<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>

Quantitativ PCR Primer Database (QPPD)

<http://lpgws.nci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer>

Universal Probe Library

<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/acercenter.jsp?id=030000>

2.11.6 Primer und Oligonukleotide (siRNA)

qPCR- Primer

Alle qPCR Primer stammen aus den Datenbanken der Primer Bank, der QPPD, der Universal Probe Library oder wurden mit Hilfe des IDT Programms neu entworfen (siehe Kapitel 2.11.5). Um auszuschließen, dass trotz rDNase Verdau bei der RNA Präparation (siehe Kapitel 2.1.1.3) noch vorhanden Reste von genomischer-DNA (gDNA) in den Proben spezifisch amplifiziert werden, wurde bei den ausgewählten und neu designten Primern stets darauf geachtet, dass das Amplikon Exon-Exon übergreifend amplifiziert wird. Primer wurden zudem stets auf ihre Genspezifität mit Hilfe der Blast-Funktion des NCBI überprüft. qPCR-Primer wurden als fertige Mixe von 10 pmol / µl je Primer in A. a. i. angesetzt (Mix 20 µM) und bei -20 °C gelagert. Die Durchführung der qPCR (siehe Kapitel 2.1.5) erfolgte für alle Primerpaare bei einer Annealing Temperatur von 60 °C.

humane qPCR- Primer

Genname	Primernamen	Sequenz (5' → 3')	Amplikon (bp)
<i>hPPARα</i>	P407_L1033	AAAAGCCTAAGGAAACCGTTCTG	225bp
	P408_R1258	TATCGTCCGGGTGGTTGCT	
<i>hPPARβ</i>	P389_L1052	TCATTGCGGCCATCATTCTGTGTG	220 bp
	P390_R1272	TTCGGTCTTCTTGATCCGCTGCAT	
<i>hPPARγ</i>	P409_L1209	TGCACTGGAATTAGATGACAGC	218 bp
	P410_R1427	TCCGTGACAATCTGTCTGAGG	
<i>hRXRa</i>	hRXRa_qfor	AGAAGGTCTATGCGTCCTTGG	119 bp
	hRXRa_grev	CAGGCATTTGAGCCCGATG	
<i>hRXRb</i>	hRXRb_qfor	GAAGCTCAGGCAAACACTAC	111 bp
	hRXRb_grev	TGCAGTCTTTGTTGTCCC	
<i>hRXRg</i>	hRXRg_qfor	GGGAAGCTGTGCAAGAAGAAA	69 bp
	hRXRg_grev	TGGTAGCACATTCTGCCTCACT	

<i>hPDK4</i>	hPDK4_up	TTGAGTGTTC AAGGATGCTCTG	141 bp
	hPDK4_dn	TGCCCCGATTGCATTCTTAAATA	
<i>hCPT1a</i>	hCPT1a_for	ACAGTCGGTGAGGCCTCTTATGAA	252 Bp
	hCPT1a_rev	CTTGCTGCCTGAATGTGAGTTGG	
<i>hADRP</i>	hADRP_for	TGTGAGATGGCAGAGAACGGT	328 bp
	hADRP_rev	CTGCTCACGAGCTGCATCATC	
<i>hANGPTL4</i> (<i>FIAF</i>)	hFIAF_qfor	GATGGCTCAGTGGACTTCAACC	117 bp
	hFIAF_qrev	CCCGTGATGCTATGCACCTTC	
<i>hCLIC1</i>	hCLIC1_qfor	CAGTGCTGAAGATGAAGGTGTC	129bp
	hCLIC1_qrev	GGTGAATCCCCGGTACTTCT	
<i>hCLIC4</i>	CLIC4_h_L87	TGAAAGCATAGGAAACTGCCC	177 bp
	CLIC4_h_R263	ACATCCGTTTTGACTTCACTGT	
<i>hRBP1</i> (Protein RET1)	hRET1_for	TGGTCAACGAGAATTTTCGAGG	109 bp
	hRET1_rev	TCACCGTCCTGCACGATCT	
<i>hFABP4</i>	hFABP4 up	AGCACCATAACCTTAGATGGGG	132 bp
	hFABP4 dn	CGTGGAAGTGACGCCTTTCA	
<i>hFABP5</i>	hFABP5_qfor	ATGAAGGAGCTAGGAGTGGGA	213 bp
	hFABP5_qrev	TGCACCATCTGTAAAGTTGCAG	
<i>hCRABP1</i>	hCRAP2_for	TCGGAAAACCTTCGAGGAATTG	103 bp
	hCRAP2_rev	CCTGTTTGATCTCCACTGCTG	
<i>hCYP26A1</i>	hCYP26A1_for	ACAAGCAGCGCAAGAAGG	111 bp
	hCYP26A1_rev	AGCTCAGCCACTGCTCCA	
<i>hCDKN1C</i> (Protein p57)	hCDKN1C up	CGGCGATCAAGAAGCTG	81 bp
	hCDKN1C dn	CGACGACTTCTCAGGCGC	
<i>hCD36</i>	hCD36 up	AAACGGCTGCAGGTCAACCTATTG	122 bp
	hCD36 dn	TCATCACCAATGGTCCCAGTCTCA	

Murine qPCR- Primer

Genname	Primername	Sequenz (5' → 3')	Amplikon (bp)
<i>mRplp0</i> (Arp0)	Arp0_for	AGATGCAGCAGATCCGCAT	318 bp
	Arp0_rev	GTGGTGATACCTAAAGCCTG	
<i>mRpl27</i> (L27)	mRib_L27qF	AAAGCCGTCAATCGTGAAGAAC	101 bp
	mRib_L27qR	GCTGTCACTTTCCGGGGATAG	
<i>mPpara</i>	mPPARaF1	TGCTGTCTCCTTGATGAAC	269 bp
	mPPARaR1	GCTTAAGCACGTGCACAATC	

<i>mPpard</i>	mPPARdF1	CTCCATCGTCAACAAAGACG	382 bp
	mPPARdR1	TCTTCTTTAGCCACTGCATC	
<i>mPparg</i>	mPPARgF1	GACCAAGTGACTCTGCTCAAG	407 bp
	mPPARgR1	CTCTGTGACGATCTGCCTGA	
<i>mRxra</i>	mRxRa_qfor	AACCCCAGCTCACCAAATGACC	338 bp
	mRxRa_qrev	AACAGGACAATGGCTCGCAGG	
<i>mRxrb</i>	mRxRb_qfor	GCTCCTCATITGCGTCTTCTCC	320 bp
	mRxRb_qrev	CGTAACAGCAGCTTGGCAAACC	
<i>mRxrg</i>	mRxRg_qfor	CCGCTGCCAGTACTGTCTG	329 bp
	mRxRg_qrev	ACCTGGTCCTCCAAGGTGAG	
<i>mCdkn1c</i>	m_p57_qFor	CGAGGAGCAGGACGAGAATC	118 bp
	m_p57_qRev	GAAGAAGTCGTTTCGCATTGGC	
<i>mCpt1a</i>	mCpt1a-qf	AGTCTGTGAGGCCACTGATG	248 bp
	mCpt1a-qr	TCGCTGCCTGAATATGGGTT	
<i>mAdrp</i>	mAdrp_for	CACAAATTGCGGTTGCCAAT	100 bp
	mAdrp_rev	ACTGGCAACAATCTCGGACGT	
<i>mAngptl4</i> (Fiaf)	mFiaf_qfor	CTCTGGGGTCTCCACCATT	140 bp
	mFiaf_qrev	TTGGGGATCTCCGAAGCCAT	
<i>mFabp4</i>	mFABP4_qfor	AAGGTGAAGAGCATCATAACCCT	132 bp
	mFABP4_qrev	TCACGCCTTTCATAACACATT CC	
<i>mFabp5</i>	MFABP5_QFOR	GGAAGGAGAGCACGATAACAAGA	73 bp
	MFABP5_QREV	GGTGGCATTGTTTCATGACACA	
<i>mCrabp2</i>	mCrabp-II_qfor	CCTGGAGCCGAGAACTGACCAA	168 bp
	mCrabp-II_qrev	TGGGAGGGAGGTTTGTGTCCTGTA	
<i>mRet1</i>	RET1_m_L34	CTGAGCAATGAGAATTTTCGAGGA	210 bp
	RET1_m_R243	GCGGTCGTCTATGCCTGTC	
<i>mClc1</i>	CLIC1_m_L364	AACCCAGCCCTCAATGACAACCTA	194 bp
	CLIC1_m_R557	ATGTGAAGCTTTGGCAGCAGGT	
<i>mClc4</i>	CLIC4_m_L317	AGCTTTCACCAAAGCACCCAGAGT	239 bp
	CLIC4_m_R555	TGTCATCTCATCGCCGTCCAGAAA	
<i>mCd36</i>	57_Cd36_left	TTGAAAAGTCTCGGACATTGAG	73 bp
	58_Cd36_right	TCAGATCCGAACACAGCGTA	
<i>mThbs-2</i>	67_Thbs2_left	GAACCAACCCTTCGGTGTT	70 bp
	68_Thbs2_right	TGGATTCTCTGGCTCACACA	

<i>mIgfbp3</i>	100_Igfbp3_left	CATCTGAAGTTCCTCAATGTGC	110 bp
	101_Igfbp3_right	CGCTTTCTGCCTTTGGAA	
<i>mPdk4</i>	mPdk4 F1	CTTTAGTTACACGTACTCCACTG	197 bp
	mPdk4 R1	ACAGACTCAGAAGATAAAGCCT	

Sequenzierprimer

Standardsequenzierprimer für gängige Vektoren und Plasmide wurden von der Firma MWG kostenlos zur Verfügung gestellt. Für alle anderen Sequenzierungen wurden je 10 µl (2 pmol / µl) eigene Primer je Sequenzierprobe zusammen mit den eingedampften Proben mit zu MWG geschickt.

Primername	Sequenz (5' → 3')	
CMVfor	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG	Standard MWG Primer
M13 rev (-29)	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	Standard MWG Primer
M13 uni (-43)	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	Standard MWG Primer
pCR3.1-BGHrev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	Standard MWG Primer
pGL rev	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC C	Standard MWG Primer
pGL3 for	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC	Standard MWG Primer
pLPCXfor	AGC TCG TTT AGT GAA CCG TCA GAT C	Eigenen Primer mitgeschickt
pLPCXrev	ACC TAC AGG TGG GGT CTT TCA TTC CC	Eigenen Primer mitgeschickt
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Standard MWG Primer

siRNA - dsOligonukleotide

Zielgen	siRNA	Zielsequenz (5' → 3')	Firma
mPaprb	siPparb#1	CCGCATGAAGCTCGAGTATGA	Qiagen, Hilden
	siPparb#2	CAAGTTCGAGTTTGCTGTCAA	
mFabp5 (Genesolution)	Mm Fabp5_1	AAACGTGTTAGTGCTAATTTA	Qiagen, Hilden
	Mm Fabp5_2	TACATGGACCTTCATGTCAAA	
	Mm Fabp5_3	TGGGTTCTTCAAGGAATTGAA	
	Mm Fabp5_4	TTCCTTTGGTTAGTAAATAAA	
All Stars neg. K.	Neg. Kontrolle	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	Qiagen, Hilden
siCdkn1c (p57)	Sc-37621	Sequenz nicht frei zugänglich.	Santa Cruz, Heidelberg

Alle kommerziellen siRNAs wurden lyophilisiert geliefert und dann entsprechend der Herstellerangaben in A. a. i. bzw. mitgeliefertem siRNA-Puffer (Qiagen, Hilden) gelöst. Die 10 µM bzw. 20 µM Lösungen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.11.7 Verwendete Plasmide

pBabe-puro	dankend erhalten von H. Land
pBabe-Cre	dankend erhalten von T. Blankenstein
3xPPRE-Tk-pGL3	dankend erhalten von T. Fauti
pCDNA3.1/zeo	Invitrogen, Karlsruhe
pCDNA-LexA-Pparb-LBD	dankend erhalten von W. Meissner
pCMX- <i>empty</i>	dankend erhalten von T. Fauti
pCMX-Gal-Pparb-LBD	dankend erhalten von R.M. Evans
pCMX-mPparb	dankend erhalten von R.M. Evans
pCR2.1® TOPO®	Invitrogen, Karlsruhe
pGL3-control	Promega, Mannheim
pGL3-basic	Promega, Mannheim
pGL3-TATAi	Institutseigene Plasmid (Jerome and Müller, 1998)
3xPPRE-TATAi-pGL3	Eigene Klonierung siehe 2.11.8
pGL3-7L-TATAi	Institutseigene Plasmid (Nettelbeck <i>et al.</i> , 1999)
pLPCX-3xFlag-mPparb	dankend erhalten von K. Kaddatz
pLPCX-puro	Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
pSG5-hRxR α	dankend erhalten von A. Baniahmad
10xGal-SV-GL3	Institutseigene Plasmid (Jerome and Müller, 1998)
puc18	New England Biolabs, Frankfurt
Ubi-His Expressionsvektor (Adhikary <i>et al.</i> , 2005)	dankend erhalten von M. Eilers

2.11.8 Klonierungsstrategien

3xPPRE-TATAi-pGL3: Das 3xPPRE-Element aus PPReX3-tk-GL3 wurde mit KpnI und BamHI ausgeschnitten und in den mittels KpnI und BglII geschnittenen pGL3-TATAi eingefügt.

2.11.9 Radioisotope

Redivue™ γ - ³² P-dATP	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Redivue™ PRO-MIX™ L-[³⁵ S] Met/Cys	Amersham Bioscience Europe, Freiburg

2.11.10 Enzyme und Proteinstandards

Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = „ <i>Calf Intestinal Phosphatase</i> “) (1 U / μ l)	Life Technologies, Karlsruhe
Benzonase (250 U / μ l)	Novagen, (Merck, Darmstadt)
Platinum Taq DNA-Polymerase (5 U / μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
Prime RNase Inhibitor™ (30 U / μ l)	Eppendorf, Hamburg
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen, Karlsruhe Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNA-Ligase (1 U / μ l)	Fermentas, St. Leon-Rot

Proteinstandards

BenchMark „ <i>Prestained Protein Ladder</i> “	Invitrogen Karlsruhe
Page Ruler™ „ <i>Prestained Protein Ladder</i> “	Fermentas, St.Leon-Rot
Page Ruler™ „ <i>Unstained Protein Ladder</i> “	Fermentas, St.Leon-Rot

2.11.11 Antikörper

<i>Erstantikörper</i>	<i>Firma</i>	<i>Verdünnung</i>
anti-mAktin (Maus, monoklonal)	Sigma, Steinheim	1:10000
anti-mFabp5 (Ziege, polyklonal)	R&D, Wiesbaden	1:2000
anti-Flag M2 (Maus, monoklonal)	Sigma, Steinheim	1:4000
anti-mPPAR β (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg	1:3000
anti-hRXR α (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg	1:2000

<i>Zweitantikörper</i>	<i>Firma</i>	<i>Verdünnung</i>
Esel-anti-Ziege, HRP-gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg	1:3000
Kaninchen-anti-Ziege, HRP-gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg	1:3000
Ziege-anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	Cell Signaling, Frankfurt	1:3000
Ziege-anti-Maus, HRP-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk (UK)	1:3000

2.11.12 Verbrauchsmaterialien

Clear Diamond Seal	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Einmalküvetten ½ Mikro	Ratiolab, Dreieich-Buchschlag
Immobilon™ P, PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid)	Millipore, Bedford (USA)
Kyroröhrchen 1 ml	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Neenah (USA)
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PCR-Tubes (0,2 ml)	Peqlab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl und 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 200 µl und 1000 µl	Sorenson BioScience, Salt Lake City (USA)
Polypropylen Reaktionsgefäße 15 ml + 50 ml	Greiner, Solingen und Sarstedt, Nümbrecht
PP-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Protran® Nitrozellulose Transfer-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Reaktionsgefäße 0,5 ml und 1+ 2 ml	Eppendorf, Hamburg und Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme: Fuji Film Super RX	Fuji, Düsseldorf
Skalpell	PfM AG, Köln
Steritop™ Express™ Plus-Filter (0,22 µm)	Millipore, Bedford (USA)
Thermo Fast® 96 PCR Plate (weiß)	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturschalen 3 cm, 6 cm und 10 cm-	Greiner, Nürtingen und Sarstedt Nümbrecht
Zellkulturplatten 6-well	Greiner, Nürtingen und Sarstedt Nümbrecht
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden

2.11.13 Chemikalien

<u>A</u> denosin <u>tr</u> iphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
A/G-Plus Agarose (Sc2003)	Santa Cruz, Heidelberg
<u>A</u> ll- <u>tr</u> ans <u>R</u> etinsäure (atRA)	Sigma, Taufkirchen
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
<u>A</u> mmonium <u>pe</u> rsulfat (APS)	GE Healthcare Bio-Sciences, München
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
<u>A</u> qua <u>ad</u> <u>i</u> n <u>ie</u> ct <u>a</u> b <u>i</u> l <u>i</u> a (A. a. i.)	Braun, Melsungen
<u>A</u> rachidon <u>sä</u> ure (AA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
B acto-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>al</u> bumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Carbaprostacyclin (cPGI)	Cayman Europe, Tallinn (Estland)
9-cis <u>R</u> etinsäure (9cisRA)	Axxora, Lörrach
Coomassie-Blue G-250	Serva, Heidelberg
<u>D</u> imethyl <u>sul</u> foxid (DMSO)	Applichem, Darmstadt
<u>D</u> ithio <u>th</u> reitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
<u>E</u> thylend <u>a</u> min <u>T</u> etra <u>a</u> cet <u>a</u> t (EDTA)	Gerbu, Gaiberg
<u>E</u> thylenglycol-bis (2-amino-ethylether) <u>T</u> etra <u>a</u> cet <u>a</u> t (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd ~37%	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin ~87%	Merck, Darmstadt

Glycylglycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
GW501516	Axxora, Lörrach
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hepes	Gerbu, Gaiberg
H ₂ O ₂ (30-%ige Lösung)	Merck, Darmstadt
Hoechst 33258	Invitrogen Karlsruhe
Imidazol (C ₃ H ₄ N ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu, Gaiberg
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
L165,041	Calbiochem (Merck, Darmstadt)
Luminol	Roth, Karlsruhe
D-Luziferin Natriumsalz	Synchem OHG, Kassel
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (MetOH)	Merck, Darmstadt
MG132	Sigma, Taufkirchen
Milchpulver, blotting grade	Roth, Karlsruhe
Mowiol® 4-88 (Polyvinylalkohol)	Calbiochem (Merck, Darmstadt)
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat-Pentahydrat (Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat dibasisch Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim

Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Polybren	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglycol 4000 (PEG)	Roche Diagnostics, Mannheim
Polyethylenimin-Lösung (PEI), hochmolekular (\varnothing Mw ~25.000)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete Mini-Tabletten (PIC)	Roche Diagnostics, Mannheim
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rosiglitazon (Avandia Filmtabletten [8mg])	GlaxoSmithKline, München
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylenylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trishydroxymehtylaminomethan (Tris Base)	Acros Organics (Belgien)
Tween 20 (Polysorbat 20)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Zitronensäure Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.11.14 Geräte

Autoclaven Bioclav und Fedegari	Schütt, Olching
AutoLumat LB953 und AutoLumat Plus LB953 Luminometer	Berthold, Düsseldorf
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Biorad Proteon II 8,6 x 7,7 cm	BioRad, München
Brutschrank BBD6120 (nicht begasbar, 37°C) -> Bakterien	Heraeus, Hanau
Brutschrank BBD6220 (CO ₂ -begasbar, 37°C) -> Zellen	Heraeus, Hanau

Dri-Block DB-3	Techne, Dexford-Cambridge (UK)
Einfrierbox Nalgene Cryo	Neerijse, Belgien
Electroblotter HEP-1 Panther™ Semi Dry	Owl separation systems, Portsmouth
Electrophoresis Power Supply E815 + E835	Consort, Tumhout (Belgien)
Electrophoresis Power Supply 1000/500	Bio Rad, München
Electrophoresis Power Supply 200/2.0	Bio Rad, München
Electrophoresis Power Supply ST504	Invitrogen, Karlsruhe
Electrophoresis Power Supply LKB-ECPS 3000/150	Amersham Bioscience Europe, Buckinghamshire (UK)
Elektrophorese-Kammer P9DS Emperor Penguin™	Owl separation systems, Portsmouth
ELISA-Reader SPECTRA MAX340	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage Sartorius Research R200D	Sartorius, Göttingen
Filmkassette BAS cassette	Fujifilm, Midwest (USA)
Filmkassette Biomax Cassette	Eastman Kodak Co, Rochester (USA)
Geltrockner Model 583 (vakuum)	Biorad, München
Heizblock HBT 130	HLC, Göttingen
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach
Ika-Vibrax-VXR	IKA-Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge J2-21 M/E mit Rotor JA-20	Beckmann, München
Leica DMR-Fluoreszenzmikroskop mit Digitalkamera (INTAS)	Leica, Wetzlar
Leitz Fluovert Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer MR2002 und MR3001 (beheizbar)	Heidolph, Schwabach
Mikroliter-Spritze	Hamilton, Bonaduz (Schweiz)
Mikrowellengerät Privileg 7533P	Quelle, Fürth
Milli-Q Water System	Millipore, Eschborn
Multifuge 3L-R (Kühlzentrifuge)	Heraeus, Hanau

NanoDrop ND-1000	PeqLab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
PCR-Gerät Peltier Thermal Cycler PTC-200	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Perfect Blue™ Doppelgel Elektrophorese System Twin L	Peqlab, Erlangen
Perfect Blue™ Gelsystem Mini S + L	Peqlab, Erlangen
Perfect Blue™ Semi Dry-Elektroblotter Sedec™	Peqlab, Erlangen
pH-Meter Inolab pH720	Inolab, Weilheim
Pipetten Gilson Pipetman classic (P2, P20, P200, P1000)	Gilson, Limburg-Offheim
Phospho-Imager: Fuji-Raytest-Scanner + Eraser für Imaging Plates	Raytest, Staubenhardt
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetboy Acu	Integra Biosciences, Zürich (Schweiz)
Präzisions-Küvette aus Quarzglas	Hellma, Mülheim
Real time PCR-Maschine Mx3000P	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Robocycler 96	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Röntgenfilm Entwicklermaschine X-Omat 2000 Processor	Kodak, Rochester (USA)
Röntgenfilmkassetten	Rego, Augsburg
Scanner FLA 3000	Fujifilm, Midwest (USA)
Schüttelinkubator AJ112	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Szintillationszähler LS 1701	Beckman, München
SDS-PAGE Mini-Protein® II	BioRad, München
Seal-Gerät ALPS™ 50V	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Sterilbank LaminAir HA2448	Heraeus, Hanau
Stickstoff Tank Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Sulzbach
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot SD Semi Dry Electrophoretic Transfer cell	BioRad, München
Überkopfrötierer für 1,5 + 2ml Reaktionsgefäße	Heidolph, Schwabach
Universalwaage Scout™ Pro	Ohaus, Pine Brook (USA)
UV-Transilluminator + Videokamera, Monitor und Videoprinter Modell PG8E	IVP, San Gabriel (USA) Mitsubishi, (Japan)

Vakuum-Zentrifuge Speedvac SC100 mit

Savant Instruments,
New York (USA)

Gefriertrocknungsanlage Leybold-Heraeus Lyovac GT2
und Drehschieber Vakuumpumpe Typ RZ8

Heraeus, Hanau
Vaccubrand, Wertheim

Vortexer REAX 2000

Heidolph, Schwabach

Vortex VF2 Ultra Turrax

IKA-Labortechnik, Staufen

Wasserbad

GFL, Burgwedel

Wasserbad Thermomix ME

Braun Biotech International,
Melsungen

Wide Mini Sub Cell für Agarosegele

BioRad, München

Zentrifuge Rotanta 460R für 96'well-Platten

Hettich, Tuttlingen

3 Ergebnisse

3.1 *In vivo rescue* des hyperplastischen Phänotyps von *Pparb*^{-/-} Endothelien in Matrigel-Plugs

Zur Untersuchung einer möglichen Rolle von PPAR β bei der Tumorentstehung und -progression wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ein PPAR β -spezifisches Maustumormodell etabliert. Mit diesem konnte gezeigt werden, dass LLC-Tumoren („*Lewis Lung Carcinoma*“) in *Pparb*-defizienten Mäusen nach anfänglicher Größenzunahme zunächst stagnieren und sich dann innerhalb von 24 Tagen fast vollständig zurückbilden. Im Gegensatz dazu führten die gleichen Tumoren in *Pparb*^{+/+}-Mäusen im selben Zeitraum zum Tod der Versuchstiere (siehe Abb. 1.4 Einleitung). Die histologische Charakterisierung der unterschiedlichen Tumoren zeigte einen Vaskularisierungsdefekt in den *Pparb*^{-/-}-Mäusen, hervorgerufen durch eine endotheliale Hyperplasie des Tumorendothels (siehe Abb. 1.5 Einleitung). Analog zu diesen *in vivo* Daten konnte der hyperplastische Phänotyp der *Pparb*^{-/-} Endothelien auch in einem alternativen *in vivo* Angiogenese-Assay mittels Matrigel-Plugs gezeigt werden (siehe Abb. 1.6 Einleitung)

Bei diesem Matrigel-Plug Assay (siehe Kapitel 2.10.2) wird das Matrigel mit den angiogenen Wachstumsfaktoren Prostaglandin E₂ (PGE₂) und FGF-2 („*basic fibroblast growth factor*“) analog den subkutanen LLC-Tumoren in die Mäuse injiziert. Durch die Wachstumsfaktoren kommt es zur Neovaskularisierung der Plugs, die den Mäusen nach drei Tagen wieder entnommen werden. Aus den eingewachsenen Endothelzellen kann dann RNA extrahiert werden, die wiederum zur Quantifizierung der Genexpression mittels *Microarray-Analyse* eingesetzt werden kann (siehe Kapitel 3.2.1). Des Weiteren ist es auch möglich, das Matrigel für einen genetischen *in vivo rescue* zu nutzen, indem man *Pparb*-Retrovirus produzierende Zellen zusammen mit dem Matrigel in Mäuse injiziert. Die einwachsenden Wirtszellen werden *in vivo* mit dem *Pparb*-Retrovirus infiziert und es kommt zur Reexpression von PPAR β in den ursprünglich *Pparb*-defizienten Wirtszellen.

Zur Herstellung von *Pparb*-Retrovirus produzierenden Zelllinien wurden zunächst syngene A1 *Pparb*^{-/-} Lungenfibroblasten mit replikationsin~~in~~kompetenten Retroviren

stabil transduziert (siehe Kapitel 2.6.3). Diese exprimieren entweder ein N-terminal-getaggtetes 3xFLAG-PPAR β Protein oder als Negativkontrolle nur den „Leervirus“. Durch Selektion mit Puromycin konnten entsprechende 3xFlag-Pparb und pLPCX Zelllinien etabliert werden. Die Validierung und Charakterisierung der neu etablierten Zelllinien ist in Kapitel 3.2.3.3 beschrieben. Anschließend wurden 3xFlag-Pparb #1 Zellen mit nahezu 100-%iger FLAG-PPAR β Expression und als Negativkontrolle pLPCX #L2 Knockout-Zellen mit einem replikationskompetenten, MoMuLV-basierten („*Moloney Murine Leukemia Virus*“) Helfervirus infiziert. In den so erhaltenen 3Fb-p (3xFlag-Pparb-„*producer*“) bzw. Lpcx-p Zellen kam es entsprechend zur Produktion von infektiösen 3xFlag-Pparb bzw. pLPCX „Leer“-Retroviren. Als zusätzliche Kontrolle wurden in einem weiteren Ansatz 3xFlag-Pparb #1 Zellen mit einem replikations*in*kompetenten pBabe „Leer“-Retrovirus transduziert. Diese 3Fb-np („*non-producer*“) Zellen waren im Gegensatz zu den beiden anderen „*producer*“ Zelllinien nicht in der Lage, infektiöse Retroviren zu produzieren. Zur Überprüfung der Infektiösität der 3Fb-p Zellen wurden *Pparb*^{-/-} Zellen mit Virus-enthaltenen Zellüberständen dieser Zellen transduziert und anschließend auf FLAG Expression mittels Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 2.9) positiv getestet (Daten nicht gezeigt).

Zur Durchführung des PPAR β *in vivo rescue* wurden dann jeweils 3Fb-p, Lpcx-p und 3Fb-np Zellen in Matrigel mit PGE₂ und FGF-2 in *Pparb*-defiziente Mäuse injiziert. Nach drei Tagen wurden die Matrigel-Plugs wieder entfernt und immunhistologisch (siehe Kapitel 2.10.2) analysiert. Die Herstellung der Paraffindünnschnitte erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. R. Moll (Pathologie, Universität Marburg), die Durchführung der immunhistologischen anti-Flag-, anti-Aquaporin-1- (AQP) und Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbungen erfolgte durch Dr. M. Kömhoff (Kinderklinik, Universität Marburg). Die Bilder wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

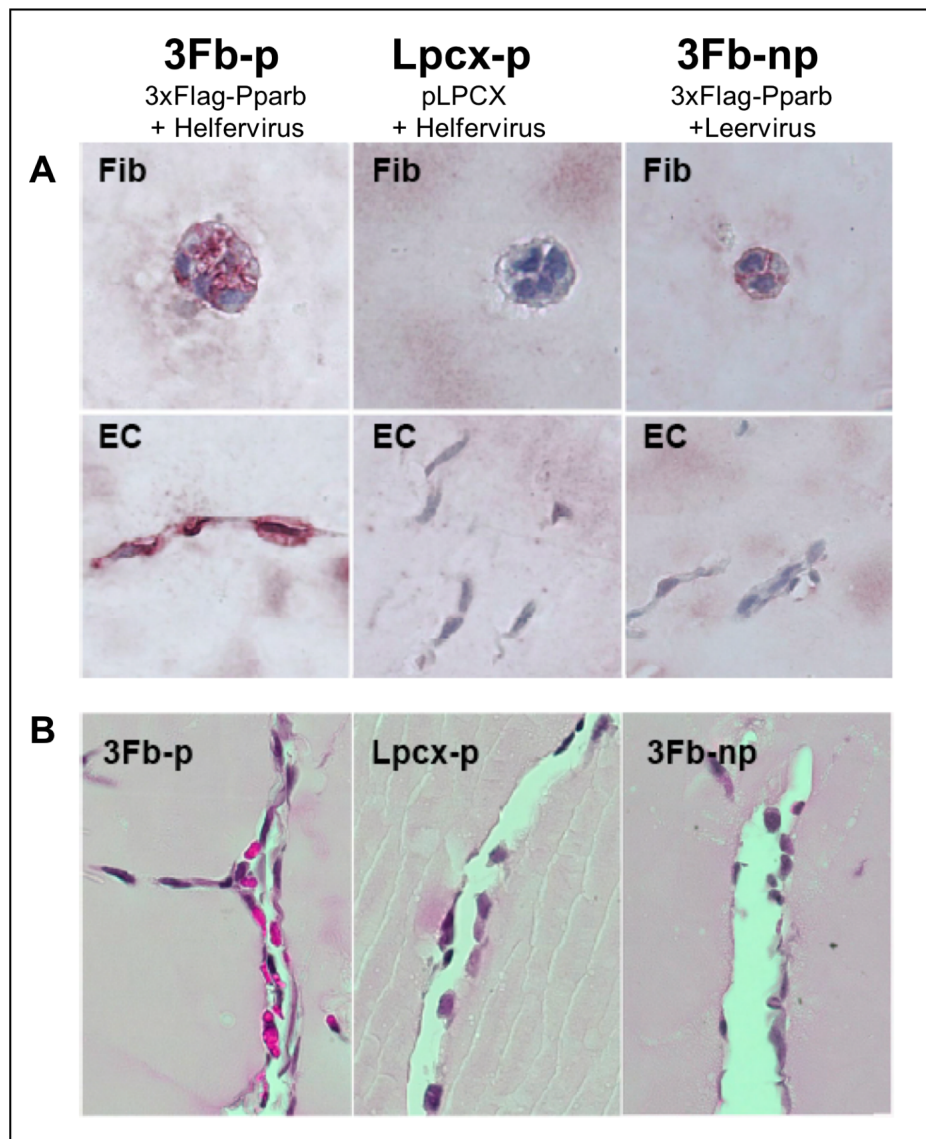


Abb. 3.1: Retrovirale *Pparb* Reexpression in *Pparb*^{-/-}-Mäusen führt zu einer morphologisch normalen Gefäßausbildung. **A)** Immunhistologische Färbung von FLAG-PPARβ positiven Zellen in Matrigel-Plugs mit Retrovirus-produzierenden Zellen. 3xFlag-Pparb #1 Zellen mit nahezu 100 % FLAG-PPARβ positiven Zellen sowie pLPCX #L2 Zellen wurden jeweils mit einem Mo-MuLV-basierten Helfervirus infiziert, um Retrovirus-produzierende Zelllinien herzustellen (3Fb-p bzw. Lpcx-p). Als zusätzliche Kontrolle wurden 3xFlag-Pparb #1 Zellen mit einem leeren pBabe Virus infiziert und als nicht-retrovirus-produzierende Zelllinie etabliert (3Fb-np). Zellen dieser drei Zelllinien wurden jeweils in mit angiogenen Wachstumsfaktoren (PGE₂ und FGF-2) enthaltenen Matrigel in *Pparb*^{-/-}-Mäuse injiziert. Nach drei Tagen wurden die Matrigel-Plugs wieder entfernt und immunhistologisch analysiert. Links: Matrigel mit in kleinen Kolonien auftretenden FLAG-PPARβ-positiven Fibroblasten (Fib) sowie FLAG-PPARβ- und Aquaporin-1-positiven (AQP-1) Wirt-Endothelzellen (EC) nach Kultivierung mit 3xFlag-Pparb Retrovirus-produzierenden 3Fb-p Zellen. Mitte: FLAG-negative Fibroblasten und FLAG-negative Wirtszellen nach Kultivierung mit Leervirus-produzierenden Lpcx-p Zellen. Rechts: FLAG-positive Fibroblasten und FLAG-negative Wirtszellen nach Kultivierung mit nicht Retrovirus-produzierenden 3Fb-np Zellen. **B)** Effekt der retroviralen Reexpression von PPARβ auf die Gefäßbildung in mit angiogenen Wachstumsfaktoren enthaltenen Matrigel-Plugs in *Pparb*^{-/-}-Mäusen. Reife und morphologisch normale Gefäße mit Erythrozyten induziert durch Kultivierung mit 3Fb-p Zellen (links), nicht jedoch durch Kultivierung mit Lpcx-p (Mitte) oder 3Fb-np Zellen (rechts). HE-Färbung an Paraffindünnschnitten. Die Bilder wurden freundlicherweise von Dr. Martin Kömhoff zur Verfügung gestellt.

Wie in Abb. 3.1.A dargestellt, konnten in den mit 3Fb-p Zellen versehenen Matrigelproben sowohl in kleinen Kolonien wachsende, FLAG-positive Fibroblasten (Fib in 3.1.A links), als auch FLAG- und AQP1-positive (Aquaporin-1) Wirts-Endothelzellen (EC) nachgewiesen werden. Im Matrigel, welches mit Lpcx-p Zellen versehen wurde, konnten dagegen weder FLAG-positive Wirtszellen noch Fibroblasten gezeigt werden (3.1.A Mitte). In den Matrigelproben, die mit den *nicht*-Retrovirus-produzierenden 3Fb-np Zellen injiziert wurden, konnten zwar FLAG-positive Fibroblasten, nicht aber FLAG-positive Wirtszellen nachgewiesen werden (3.1.A rechts). Zudem konnten in Paraffindünnschnitten aus 3Fb-p Matrigelproben morphologisch normale, Erythrozyten enthaltende Blutgefäße gezeigt werden (3.1.B links), Strukturen, die weder in Lpcx-p bzw. 3Fb-np Matrigelproben nachweisbar waren (3.1.B Mitte bzw. rechts)

Die durch die Reexpression von PPAR β wieder auftretenden morphologisch normalen und funktionsfähigen Gefäße sind ein klarer Beweis dafür, dass PPAR β einen entscheidenden Beitrag zur Tumervaskularisierung in dem Maustumormodell leistet. Um zu verstehen, auf welche Weise PPAR β Einfluss auf die Tumorangio-genese nimmt, ist es wichtig, PPAR β -Zielgene zu identifizieren, die direkt in die Tumorangio-genese involviert sind. Um solche potentiellen Zielgene zu identifizieren, wurde mit zwei unterschiedlichen Ansätzen gearbeitet, auf die in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll.

3.2 Identifizierung, Validierung und Charakterisierung potentieller PPAR β Zielgene

Um auf molekularer Ebene Zielgene zu identifizieren, die für die unterschiedlichen PPAR β -abhängigen Phänotypen des Maustumormodells verantwortlich sein könnten, wurde mit zwei experimentell unterschiedlichen Ansätzen gearbeitet. Zum einen wurden *Microarray* Untersuchungen mit Endothelzellen aus den Matrigel-*Plug Assay* Proben durchgeführt (siehe Kapitel 2.10.2 und 3.1).

Zum anderen sollte in einem alternativen Ansatz durch Vergleich des Proteoms von Lungenfibroblastenzelllinien aus *Pparb*^{-/-} und *Pparb*^{+/+}-Mäusen weitere potentielle Zielgene identifiziert werden (Adamkiewicz *et al.*, 2007).

Dazu wurden fraktionierte Proteinextrakte aus den unterschiedlichen Zelllinien hergestellt und anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Identifizierung differenziell exprimierter Proteine erfolgte durch Vergleich der nach Silberfärbung sichtbaren Proteinspots, deren Zuordnung und weitere Charakterisierung mittels massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF und PMF-Analyse).

Um potentielle Zielgene, die im *Microarray* oder in der 2D-Gelelektrophorese eine differenzielle Expression zeigten, auf ihre PPAR β -Abhängigkeit zu validieren (siehe Kapitel 3.2.3), wurde mit verschiedenen Knockout-, Knockdown- und *rescue*-Zellkultursystemen gearbeitet. Der besondere Fokus lag dabei auf solchen Genen, die für regulatorische Proteine kodieren und für die bereits eine Rolle bei der (Tumor-) Angiogenese oder aber der Zellproliferation beschrieben worden war.

3.2.1 Identifizierung von Zielgenen via *Microarray*-Analysen

Zur Identifizierung von Zielgenen, die an der Ausbildung des hyperplastischen Phänotyps der *Pparb*^{-/-} Endothelien beteiligt sind, wurden *Microarray*-Analysen mit RNA aus Endothelzellen durchgeführt, die mit Hilfe von Matrigel-*Plug Assays* aus *Pparb*^{+/+} und *Pparb*^{-/-}-Mäusen gewonnen wurden (siehe Kapitel 2.10.2). Die Durchführung der *Microarrays* sowie deren Auswertung erfolgte durch Dr. Wolfgang Meißner und Birgit Samans.

39 Gene zeigten eine erhöhte Expression in *Pparb* Wildtyp-Zellen gegenüber ihren *Pparb*^{-/-}-Pendants, während 27 Gene eine geringere Expression zeigten (Schwellenwert: 1,7-facher Expressionsunterschied). Tabelle 3.1 zeigt eine Auswahl an regulierten Genen, die bereits als PPAR Zielgene beschrieben worden sind und/oder für die bereits eine Rolle in der Angiogenese, der Zellproliferation bzw. der Zelldifferenzierung nachgewiesen werden konnte.

Zur Bestätigung der *Microarray*-Daten wurde ein Teil der putativen Zielgene mittels SYBR[®]-Green basierter qPCR (siehe Kapitel 2.1.5) in den Matrigel-Proben aus *Pparb*^{+/+} und *Pparb*^{-/-}-Mäusen analysiert. Die so erhaltenen Ergebnisse konnten die Daten der *Microarray*-Analyse weitgehend bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.1: Microarray-Analyse von differenziell exprimierten Genen von *Pparb*^{+/+} und *Pparb*^{-/-} Zellen aus Matrigel-Plugs. Aufgelistet ist eine Auswahl an regulierten Genen. Die erste Spalte zeigt die relative Genexpression *Pparb* Wildtyp- versus *Pparb* null-Zellen. (Grün: höhere Expression in Wildtyp (wt). Gene die bereits als PPAR Zielgene beschrieben wurden sind in blau dargestellt. *Gene wurden nicht weiter analysiert. (Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. W. Meißner zur Verfügung gestellt).

Wt / null	Genname	Symbol	Funktion
2.1	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	<i>Fabp4</i>	Lipidmetabolismus
2.0	Acyl-CoA dehydrogenase, long-chain	<i>Acadl</i> *	Lipidmetabolismus
2.0	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	<i>Scd1</i> *	Lipidmetabolismus
1.9	Thrombospondin receptor / Fatty acid translocase	<i>Cd36</i>	Rezeptor für oxidiertes LDL, Thrombospondine und Kollagen
1.8	Insulin-like growth factor binding protein 3	<i>Igfbp3</i>	Modulator der IGF Aktivität; Inhibitor der Zellproliferation
1.7	Thrombospondin-2	<i>Thbs2</i>	Inhibitor von Endothelzellproliferation, Modulator der Angiogenese
1.7	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57)	<i>Cdkn1c</i>	Zellzyklusinhibitor

Neben den bereits bekannten PPAR Zielgenen waren jedoch besonders solche von Interesse, die in direktem Zusammenhang mit der Zellproliferation bzw. Angiogenese gebracht werden konnten. Besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Gen *Cdkn1c*, welches als negativer Regulator des Zellzyklus für den Zellzyklusinhibitor p57^{Kip2} codiert (Lee *et al.*, 1995) sowie auf den Genen für den Thrombospondinrezeptor *Cd36* (Fettsäure Translokase) bzw. dessen Ligand Thrombospondin 2 (*Thbs2*). Für die beiden Letzteren konnte in früheren Studien bereits ein regulatorischer Einfluss auf die Tumorangiogenese nachgewiesen werden (Armstrong and Bornstein, 2003).

3.2.2 Identifizierung von Zielgenen durch Vergleich von Proteinprofilen

Um in einem alternativen Ansatz potentielle PPAR β Zielgene zu identifizieren, wurde das Proteinprofil verschiedener Lungenfibroblastenzelllinien aus *Pparb*^{-/-} und *Pparb*^{+/+} - Mäusen mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert.

Fraktionierte Proteinextrakte (aus Zytosol-, Membran-, Mitochondrien- und Kernfraktionen sowie Gesamtzellextrakte) wurden mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und differenziell exprimierte Proteine durch Vergleich der Proteinspots

nach Silberfärbung identifiziert. Die Zuordnung und Charakterisierung der Proteine erfolgte anschließend massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF und PMF-Analyse. Die Durchführung und Auswertung der 2D-Gelelektrophoresen sowie die weiterführenden Analysen via MALDI-TOF und PMF-Analyse erfolgten durch Dr. Jürgen Adamkiewicz und Bernhard Wilke.

Mit diesem experimentellen Ansatz konnten 31 differenziell exprimierte Proteine aus funktionell unterschiedlichen Kategorien identifiziert werden. Wie zu erwarten, waren auch hier Proteine des Intermediärstoffwechsels vertreten. Tabelle 3.2 zeigt eine Auswahl an differenziell exprimierten Proteinen, die aufgrund ihrer Bedeutung in der Tumorigenese bzw. der Zelldifferenzierung später auch weiter untersucht wurden.

Tabelle 3.2: Durch Vergleich von Proteinprofilen von *Pparb*^{+/+} und *Pparb*^{-/-} Lungenfibroblastenzelllinien identifizierte, differenziell exprimierte Proteine. Aufgelistet ist eine Auswahl differenziell exprimierter, regulatorischer Proteine, die mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF und PMF-Analyse identifiziert wurden. Neben dem Proteinnamen, (Spalte 1 und 3) und der Accession-Nummer (Spalte 2) ist das Expressionsniveau in den *Pparb*^{-/-} Lungenfibroblastenlinien angegeben (Spalte 4). Rot niedrigere und grün höhere Expression in *Pparb*^{-/-} im Vergleich zum Wildtyp. Spalte 5 zeigt die subzellulären Fraktionen in denen das Protein nachgewiesen werden konnte. (Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. J. Adamkiewicz zur Verfügung gestellt).

Protein	Accession-Nr.	Name	Expression in <i>Pparb</i> ^{-/-}	Subzelluläre Fraktion
CLIC1_Maus	Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1	↓	-Zellulär; -Membran
CLIC4_Maus	Q9QYB1	Chloride intracellular channel protein 1	↓	-Zellulär; - Gesamtzellextrakt
RET1_Maus	Q00915	Retinol-binding-protein 1, cellular	↑	-Zellulär

3.2.3 Validierung von putativen PPARβ Zielgenen

Zur weiteren Validierung der mittels *Microarray-Analyse* und 2D-Gelelektrophorese identifizierten putativen PPARβ Zielgene wurde deren Expression, mittels *SYBR*[®]-Green basierter qPCR (siehe Kapitel 2.1.5). in unterschiedlichen und unabhängigen PPARβ-Knockout, -Knockdown, und -rescue Zellkultursystemen sowie nach spezifischer Ligandenaktivierung (GW501516) analysiert. Weiterhin wurden die Auswirkungen auf die Expression der beiden anderen PPAR Subtypen sowie auf deren Heterodimerisierungspartner RXR untersucht. Die Funktionalität der verschiedenen

Testsysteme konnte zudem durch Analyse der Expression der bereits beschriebenen, zumeist Stoffwechsel-regulatorischen PPAR β Zielgene *Adrp* („*adipose differentiation related protein*“) (Dressel *et al.*, 2003; Schmuth *et al.*, 2004); *Angptl4* („*angiopoietin-like 4*“ oder auch *Fiaf* = „*fasting-induced adipose factor*“ genannt) (Schmuth *et al.*, 2004); *Cpt1a* („*carnitine palmitoyltransferase 1a*“) (Dressel *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003) und *Pdk4* („*pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4*“); (Degenhardt *et al.*, 2007; Dressel *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003) gezeigt werden.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die unterschiedlichen Testsysteme zunächst kurz vorgestellt und die Ergebnisse für die aufgrund ihrer beschriebenen Funktion in der Zellzykluskontrolle und Tumorangiogenese besonders interessantesten putativen Zielgene *Cdkn1c*, *Cd36* und *Thbs2* zusammengefasst. Einen Überblick über die Expressionsdaten aller untersuchten Gene in den verschiedenen Zellsystemen gibt zudem Tabelle 3.3.

3.2.3.1 siRNA-vermittelter *Pparb*-Knockdown in NIH3T3 Zellen

Mit Hilfe der siRNA-Technologie ist es möglich, die Expression eines Gens spezifisch und zeitlich begrenzt zu reduzieren. Zur Validierung potentieller PPAR β Zielgene wurden murine NIH3T3 Zellen im Abstand von 72 h zweimal mit einer *Pparb*-spezifischen siRNA oder einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert (siehe Kapitel 2.3.2). Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 0,3 μ M des PPAR β -spezifischen Liganden GW501516 (GW) für 6 h bzw. 24 h. Nach RNA-Isolation und cDNA Synthese erfolgte die Analyse der Proben mittels SYBR[®]-Green basierter qPCR (siehe Kapitel 2.1.5).

Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit sensitiver PPAR β Antikörper war eine Überprüfung des Knockdowns auf Proteinebene nicht möglich. Die Validierung des *Pparb*-spezifischen Knockdowns erfolgte daher jeweils 48 h nach den siRNA Transfektionen mittels qPCR. Die Expression von *Pparb* war dabei mindestens 75 % niedriger als in den entsprechenden mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (Abb. 3.2). Als zusätzliche Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen.

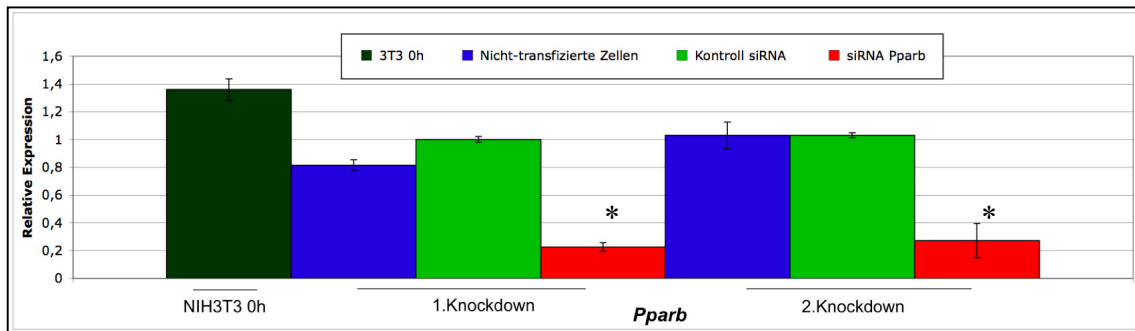


Abb. 3.2: siRNA-vermittelter Pparb Knockdown in NIH3T3 Zellen. NIH3T3 Zellen wurden zweimal hintereinander mit Pparb-spezifischer (rot) oder Kontroll-siRNA (hellgrün) transfiziert. Als zusätzliche Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen (blau). Jeweils 48 h nach der Transfektion wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Überprüfung des Knockdowns erfolgte via komparativer qPCR. Dargestellt ist die *Pparb* Expression relativ zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Kontroll-siRNA = 1), Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. Dunkelgrün: *Pparb*-Expression vor der ersten siRNA Transfektion (NIH3T3 0 h; Ct *Pparb* = 29,32 normalisiert auf *Rpl27* Ct = 18). *Signifikante Unterschiede zur Kontroll-siRNA behandelten Probe ($p < 0,01$ zweiseitiger Students *t*-Test, gleicher Varianz).

Die Funktionalität des Knockdowns konnte durch die Analyse etablierter PPAR β Zielgene klar bestätigt werden. Exemplarisch dafür zeigt *Angptl4* nach Aktivierung (GW) in den Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine deutliche Induktion (5,5-fach nach 6 h und 15-fach nach 24 h), wohingegen es durch den Knockdown zur Aufhebung der Repression durch PPAR β und damit ebenfalls zur Induktion kommt (3,3-fach nach 6 h und 1,9-fach nach 24 h) (Abb. 3.3).

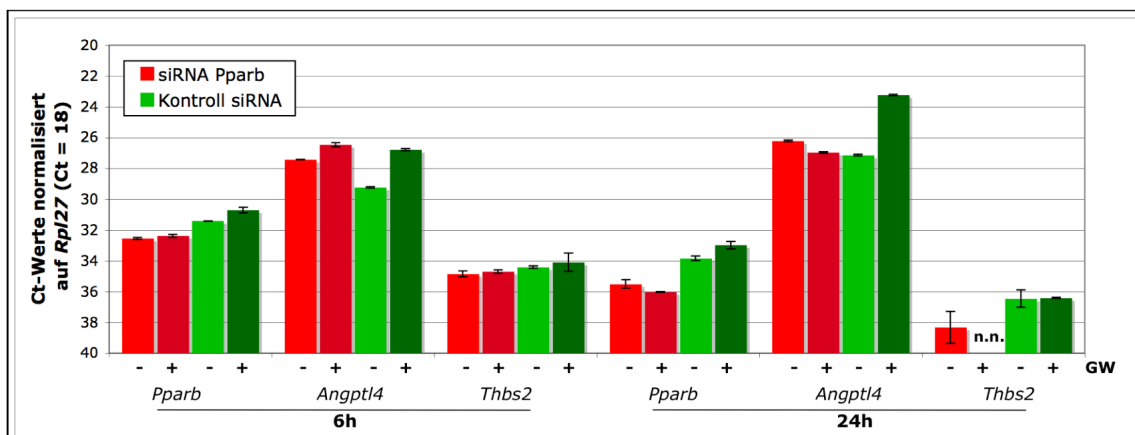


Abb. 3.3: Expression von Pparb sowie von potentiellen Zielgenen nach siRNA Knockdown von Pparb in NIH3T3 Zellen. Zellen wurden mit Pparb-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend für 6 h bzw. 24 h mit DMSO oder 0,3 μ M GW501516 (GW) behandelt. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels komparativer qPCR analysiert. Expressionsdaten für *Pparb* und *Thbs2*. *Angptl4* diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind Durchschnitts-Ct-Werte (Triplikate \pm Standardabweichung), normalisiert auf *Rpl27* (Ct = 18).

Die Expression von *Cdkn1c* und *Cd36* war unter diesen Bedingungen in NIH3T3 Zellen nicht nachweisbar. *Thbs2* zeigt dagegen in den PPAR β Knockdown Zellen nach 6 h

eine um ca. 30 % und nach 24 h eine um ca. 70 % niedrigere Expression. Ein leichter GW-Effekt ist zudem in den Kontroll-siRNA behandelten Zellen nach 6 h (1,3-fach) zu beobachten, nicht jedoch in den siPparb behandelten Zellen (Abb. 3.3). Nach 24 h sind positive GW-Effekte jedoch nicht mehr nachweisbar.

Um weitere Anhaltspunkte für die PPAR β -Abhängigkeit der putativen Zielgene zu erlangen, besonders auch für solche, deren Expression im Knockdown-System nicht nachweisbar war, wurde die Expression in einem konditionalen Knockout-System überprüft (siehe Kapitel 3.2.3.2).

3.2.3.2 Cre-vermittelter konditionaler Flox-*Pparb* Knockout in Lungenfibroblasten-Zelllinien

Barak und Kollegen beschrieben 2002 eine konditionale PPAR δ^{ck} Knockout-Maus (Barak *et al.*, 2002). Diese Maus wurde unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und daraus von Dr. J. Adamkiewicz embryonale Lungenfibroblastenzelllinien etabliert (z. B. Flox1). Die PPAR δ^{ck} -Maus enthält ein mit *loxP* Sequenzen („*locus of crossover of P1*“) markiertes Exon 4 im *Pparb* Locus. Durch Expression einer Cre (*cyclisation recombination*) -Rekombinase kommt es zur Exzision des Exons 4 und damit zum PPAR β -spezifischen Knockout. Zur Untersuchung der PPAR β -Abhängigkeit der putativen Zielgene wurden daher Flox1 Lungenfibroblasten mit einem Cre-exprimierenden Retrovirus bzw. einem Leevirus (pBabe-puro) infiziert (siehe Kapitel 2.6.2). Nach RNA-Isolation und cDNA Synthese erfolgte die Analyse der Proben mittels SYBR[®]-Green basierter qPCR (siehe Kapitel 2.1.5).

Wie die Überprüfung der *Pparb* Expression mit einem Exon 4 spezifischen Primer zeigt, kommt es nicht in allen Fibroblastenzellen zum PPAR β Knockout (Abb. 3.4). Dies ist wahrscheinlich auf eine unvollständige Infektion mit dem retroviralen Cre-Virus zurückzuführen. Da Retroviren nur proliferierende Zellen infizieren, wird selten eine Infektionsrate von 100 % erreicht. Zudem wurden die Zellen nicht zusätzlich selektioniert.

Die mit Cre-Virus infizierten Zellen (Flox-Cre) zeigen trotzdem nur noch ca. 30 % der *Pparb*-Expression im Vergleich zu den mit dem „Leervirus“ infizierten Zellen (Flox-pBabe). Auch alle etablierten Zielgene zeigen in den Cre-Virus infizierten Zellen eine zwischen 11 % (*Angpl4*) und 84 % (*Pdk4*) verminderte Expression und untermauern

damit die prinzipielle Funktionalität des Testsystems. Vergleichbar vermindert sich im konditionalen Knockout auch die Expression der potentiellen Zielgene. So zeigt der Zellzyklusinhibitors $p57^{Kip2}$ (*Cdkn1c*) eine um 73 %, Thrombospondin 2 (*Thbs2*) sogar eine um 82 % verminderte Expression, während *Cd36* auch in diesen Fibroblastenzellen nicht nachzuweisen war (Abb. 3.4).

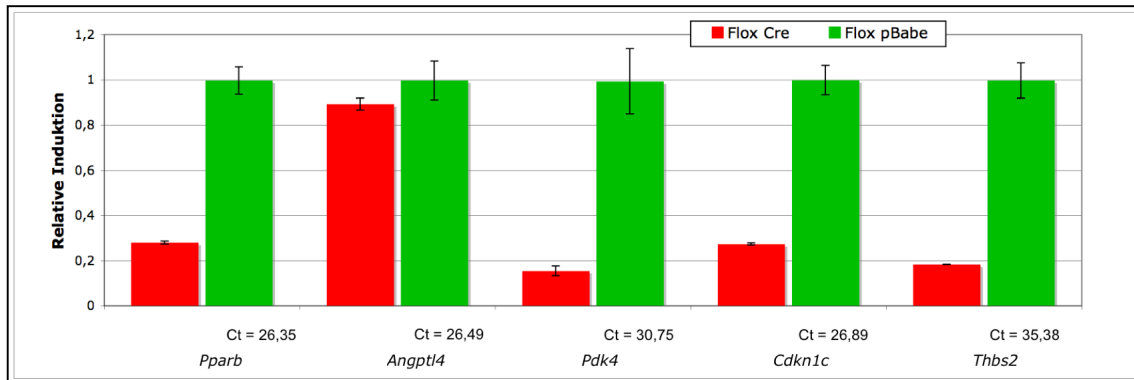


Abb. 3.4: Expression von *Pparb* und potentiellen *PPARβ* Zielgenen in konditionalen *Flox-Pparb* Knockout-Zellen. Flox-*Pparb* Lungenfibroblasten wurden mit einem retroviralen Cre-Virus oder Kontroll-Virus (pBabe) stabil transduziert. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels komparativer qPCR analysiert. Dargestellt ist die relative Induktion bezogen auf mit Kontroll-Virus infizierte Zellen (Flox-pBabe = 1). Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. Zusätzlich sind jeweils die Durchschnitts-Ct-Werte, normalisiert auf *Rplp0* (Ct = 18) der Flox-pBabe Proben angegeben. Expressionsdaten von *Pparb*, den etablierten Zielgenen *Angptl4* und *Pdk4* sowie der putativen Zielgene *Cdkn1c*, *Thbs2*.

Da nicht alle Zellen erfolgreich mit dem retroviralen Cre-Virus transduziert werden konnten, handelt es sich bei dem hier verwendeten Testsystem um eine Mischpopulation aus Knockout- und Wildtyp-Lungenfibroblasten. Es ist daher wahrscheinlich, dass es zur Vermischung bzw. Überlappung von Effekten aus Knockout- und Wildtypzellen gekommen ist, was bei der Interpretation der Expressiondaten berücksichtigt werden muss.

Um die Problematik des unvollständigen Knockouts zu umgehen, wurden in einem alternativen Ansatz daher Zelllinien etabliert, in denen *Pparb* mittels genetischem *rescue* in *Pparb*^{-/-} Fibroblasten wieder reexprimiert wurde. Die Auswirkungen der Reexpression auf die putativen Zielgene wurden anschließend via qPCR analysiert (siehe Kapitel 3.2.3.3.2 und 3.2.3.3.3).

3.2.3.3 3xFlag-Pparb *rescue* Klone

3.2.3.3.1 Etablierung von 3xFLAG-PPAR β exprimierenden Zelllinien mittels retroviralear Transduktion

Als Grundlage für den *in vivo rescue* in Matrigel-Plugs (siehe Kapitel 3.1) sowie zur weiteren Validierung und funktionalen Charakterisierung möglicher PPAR β Zielgene sollte ein *Pparb*-Knockout bzw. „Wildtyp“ System auf der Grundlage einer *Pparb*^{-/-} Lungenfibroblastenzelllinie etabliert werden. Dazu sollten mit Hilfe eines genetischen retroviralear *rescue*-Ansatzes stabile Zelllinien etabliert werden, die in einem syngenem *Pparb*^{-/-} Hintergrund PPAR β reexprimieren. Der Vorteil dieses Systems begründet sich durch den genetisch identischen Hintergrund, da sowohl „Wildtyp“ als auch Knockout-Kontrolle auf dieselbe etablierte A1 *Pparb*^{-/-} Fibroblastenzelllinie zurückzuführen sind. Dies sollte biologisch bedingte Schwankungen zusätzlich minimieren. Durch die Selektion positiv infizierter Zellen sollte zudem das für den konditionalen Knockout aufgetretene Problem des unvollständigen Knockouts (bzw. hier unvollständigen *rescues*) umgangen werden.

Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit ausreichend sensibler Antikörper zur Detektion physiologischer Mengen an PPAR β wurde für diesen Ansatz ein N-terminal 3xFLAG-getaggtetes PPAR β -Fusionsprotein eingesetzt. Die Funktionalität dieses Fusionsproteins wurde zuvor in einem PPARE-gekoppelten Luziferase-Reportergenassay (vgl. 2.4.3) überprüft (Daten nicht gezeigt). Nach Herstellung infektiöser 3xFlag-Pparb- und pLPCX-Kontrollretroviren (siehe Kapitel 2.6.1) wurden mit diesem A1 *Pparb*^{-/-} Lungenfibroblasten transduziert und anschließend mittels Puromycin selektioniert (siehe Kapitel 2.6.3).

Die Überprüfung der PPAR β -Expression in den etablierten 3xFlag-Pparb-Zelllinien erfolgte indirekt durch Nachweis der FLAG-Expression mittels FLAG-spezifischer Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 2.9). Die Zellklone (#) 3xFlag-Pparb #1 und #3 zeigten beide nahezu 100 % positive FLAG-Signale (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die PPAR β -Expression direkt und indirekt via Western Blot Analyse verifiziert. Wie Abbildung 3.5 zeigt, exprimieren beide Klone das 52,8 kDa große 3xFLAG-PPAR β Fusionsprotein (Bahn 1 + 5 bzw. #3 Bahn 2 + 6), während im Kontrollklon pLPCX #L2 keine FLAG- bzw. PPAR β -Expression nachweisbar ist (Bahn 3 und 7). Dabei ist die FLAG-PPAR β -Expression im Klon #1 stärker als die des

Klons #3. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte aus NIH3T3 Zellen, die das 3xFLAG-PPAR β Protein transient überexprimieren. Trotz identischer Proteinmengen ist der Unterschied in der Sensitivität zwischen FLAG-spezifischen (Bahnen 1-4) und PPAR β -spezifischen (Bahnen 5-8) Antikörpern deutlich sichtbar.

Neben dem Fusionsprotein ist in der Positivkontrolle (NIH3T3) auch das PPAR β Wildtyp-Protein mit dem PPAR β -spezifischen Antikörper nachweisbar (Bahn 4). Dies ist wahrscheinlich möglich, da es in Folge der starken Überexpression des Fusionsproteins zu einer Oligomerisierung des Rezeptors kommt (vgl. Rieck *et al.*, 2007).

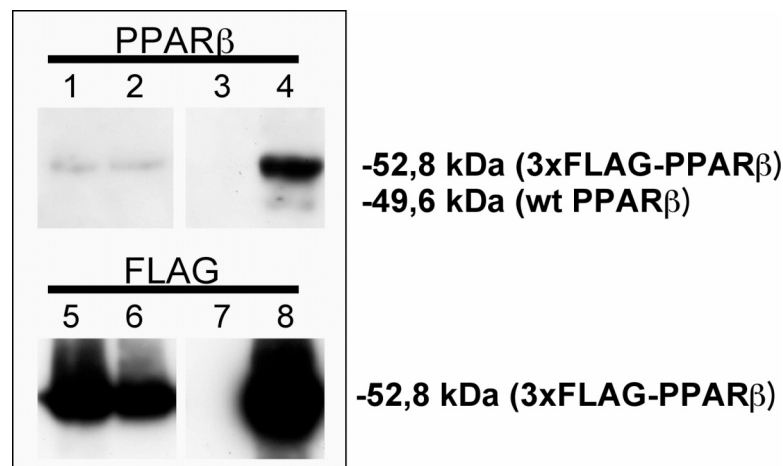


Abb. 3.5: 3xFLAG-PPAR β Expression in neu etablierten 3xFlag-Pparb rescue Klonen. Western Blot Analyse. *Pparb*^{-/-} Fibroblasten wurden retroviral mit einem 3xFlag-Pparb bzw. Leervirus stabil transduziert. Dargestellt ist der Nachweis der 3xFLAG-PPAR β -Expression in den neu etablierten Zelllinien 3xFlag-Pparb Klon #1 (Bahn 1 und 5) und #3 (Bahn 2 und 6) sowie des Kontrollklons pLPCX #L2 (Bahn 3 und 7). Die gleichmäßige Proteinladung wurde mittels Ponceau S Färbung überprüft. Als Positivkontrolle wurde 3xFLAG-PPAR β transient in NIH3T3 Zellen überexprimiert (Bahn 4 und 8). Bahnen 1 - 4 Nachweis mit anti-PPAR β spezifischem Antikörper. Bahnen 5 - 8 mit anti-FLAG spezifischem Antikörper.

Für die weitere Validierung potentieller PPAR β Zielgene wurden sowohl die Zellen des Klon #1 als auch die des Klon #3 in unterschiedlichen Kinetiken eingesetzt (siehe nachfolgende Kapitel). Die Zellen des 3xFlag-Pparb #1 dienten zudem bereits als Grundlage für den *in vivo rescue* des hyperplastischen Phänotyps in Matrigel-Plugs (siehe Kapitel 3.1).

3.2.3.3.2 Validierung von Genen in 3xFlag-Pparb Klon 1 *rescue* Zellen

Zur weiteren funktionalen Validierung der mittels retroviralem *rescue* etablierten 3xFlag-Pparb #1 und pLPCX #L2 Kontroll-Zelllinie wurden die Zellen für 48 h mit DMSO oder 1 μ M des PPAR β -spezifischen Liganden GW501516 stimuliert. Nach RNA-Isolation und cDNA Synthese erfolgte die Analyse der Proben mittels SYBR®-Green basierter qPCR (siehe Kapitel 2.1.5).

Auch hier bestätigte sich die Funktionalität des *rescues* durch Analyse der etablierten PPAR β Zielgene. Vergleichbar zum Knockdown-System (siehe Kapitel 3.2.3.1) zeigt z. B. *Angptl4* eine deutliche GW-abhängige Induktion nach 48 h (*Angptl4* = 42,2-fach) sowie eine erhöhte basale Expression im pLPCX Knockout (1,4-fach). Wie die weitere Charakterisierung des *rescue*-Zellsystems zeigen konnte, kommt es durch die retrovirale Reexpression von 3xFLAG-PPAR β im Vergleich zu den anderen Zelllinien (Flox1, NIH3T3 und HaCaT) zu einer auf mRNA Ebene deutlich stärkeren Expression des *Pparb* Subtyps ($Ct^{Pparb} \sim 20$). Auch im Vergleich zu den beiden anderen Subtypen ist *Flag-Pparb* hier deutlich stärker exprimiert ($Ct^{Ppara} \sim 30$ und $Ct^{Pparg} \sim 28$) (siehe Tabelle 1.3). Zudem führt die GW-Behandlung im Klon #1 zu einer Abnahme der PPAR β -Expression um 35 %. Zu beachten ist dabei jedoch, dass Flag-Pparb hierbei nicht unter der Kontrolle des Wildtyp-Promotors exprimiert wird, sondern durch einen viralen CMV-Promotor reguliert wird.

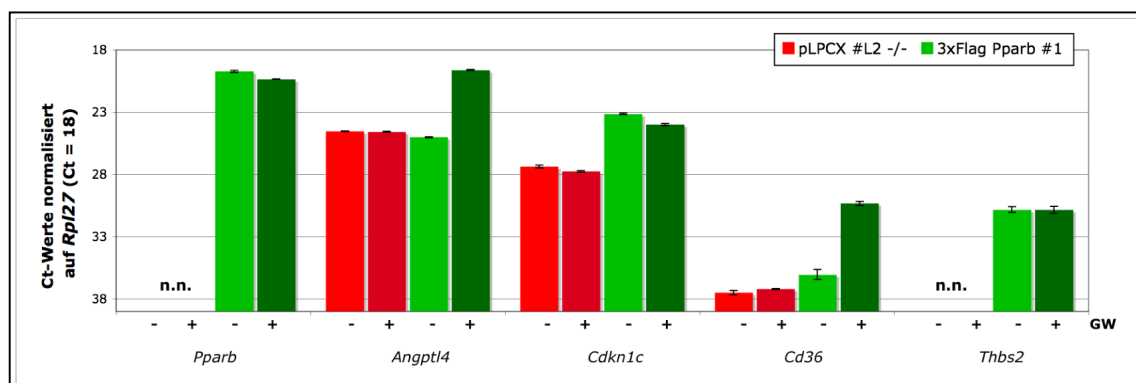


Abb. 3.6: Expression von *Pparb* und potentieller PPAR β Zielgene in pLPCX #L2 und 3xFlag-Pparb #1 *rescue* Zellen. Retroviral stabil transduzierte 3xFlag-Pparb #1 und pLPCX #L2 Kontrollzellen wurden für 48 h mit DMSO oder 1 μ M GW501516 (GW) behandelt. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels komparativer qPCR analysiert. Dargestellt sind Durchschnitts-Ct-Werte (Triplikate \pm Standardabweichung), normalisiert auf *Rpl27* ($Ct = 18$). Expressionsdaten von *Pparb* sowie der putativen Zielgene *Cdkn1c*, *Cd36* und *Thbs2*. *Angptl4* diente als Positivkontrolle. (n. n.: Expression nicht nachweisbar).

Bei der Validierung der potentiellen Zielgene *Thbs2* und *Cdkn1c* konnte jeweils eine klare PPAR β -Abhängigkeit nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Während *Cdkn1c* ungefähr 18,7-fach schwächer im pLPCX Knockout exprimiert wird, waren die Expressionsdaten für *Thbs2* aufgrund der geringen Expression unter diesen Bedingungen nicht mehr auswertbar. Die Behandlung mit GW führte beim Zellzyklusinhibitor *Cdkn1c* zu einer Abnahme der Expression von ca. 25 % im Knockout-Klon und 45 % im Klon #1, für *Thbs2* war indes keine GW-Regulation zu beobachten. Auch der Thrombospondinrezeptor *Cd36* zeigt eine klare PPAR β -Abhängigkeit bereits in der basalen Expression (Abb. 3.6), zudem lässt sich die Expression im *rescue*-Klon zusätzlich 51,7-fach durch GW501516 induzieren.

3.2.3.3.3 Validierung von Genen in 3xFlag-Pparb Klon #3 *rescue* Zellen

Zur grundsätzlichen Bestätigung der mit Hilfe des 3xFlag Pparb #1 erhaltenen Expressionsdaten und zur weiteren Validierung der Funktionalität des *rescue*-Systems wurde die Expression der Zielgene in einem zweiten *rescue*-Klon analysiert. Um jedoch primäre regulatorische Effekte von sekundären besser trennen zu können, wurde zum einen die RNA bereits nach 6 h geerntet, zum anderen wurde die Konzentration des spezifischen Liganden GW501516 von 1 μ M auf 0,3 μ M gesenkt. GW501516 hat zwar eine etwa 1000-fach höhere Affinität zu PPAR β im Vergleich zu den beiden anderen PPAR-Subtypen (EC_{50} = 1 nM) (Oliver *et al.*, 2001), trotzdem konnten im pLPCX Knockout-Klon GW-abhängige, PPAR β -unabhängige Effekte beobachtet werden (siehe Spalte 3a pLPCX +GW Tabelle 1.3). Die eingesetzte GW-Konzentration war zuvor in einer Titration durch Analyse der Aktivierbarkeit von *Cpt1a* und *Pdk4* nach 9 h in NIH3T3 Zellen ausgetestet worden (Daten nicht gezeigt).

Wie die Analyse der Expressionsdaten der verschiedenen Zielgene und Kernrezeptorsubtypen für den 3xFlag-Pparb #3 zeigte, können die für den Klon #1 erhaltenen Daten in Bezug auf die PPAR β -Abhängigkeit und GW-Stimulation für die meisten Gene, insbesondere für die bereits etablierten Zielgene, aber z. B auch für *Cdkn1c*, weitgehend reproduziert werden (siehe Tabelle 1.3). Lediglich bei den Expressionsniveaus der einzelnen Gene kommt es zu teils deutlichen Unterschieden. Anders jedoch als im Klon #1 konnte die Expression der Gene *Cd36*, *Thbs2*, *Clic1*, *Ppara* und *Pparg* unter diesen Bedingungen im pLPCX #L2 und 3xFlag-Pparb #3 nicht

nachgewiesen werden. Zudem war die Expression von *Pdk4* im Klon #3 lediglich nach GW-Stimulation nachweisbar (siehe Tabelle 1.3).

Die trotz reduzierter GW-Konzentration im Knockout zu beobachtenden GW-abhängigen Regulationen sind wahrscheinlich auf unspezifische, PPAR-unabhängige Nebeneffekte dieser Substanz zurückzuführen (siehe Spalte 3b Tabelle 1.3).

3.2.3.4 Validierung potentieller PPAR β Zielgene in humanen Keratinozyten (HaCaT)

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, übernehmen die PPARs in der Haut wichtige Funktionen bei der Zelldifferenzierung, der Wundheilung und der Regulation des Lipidstoffwechsels (siehe Kapitel 1.2.8.2.8).

Zur weiteren Validierung möglicher PPAR β Zielgene wurden daher humane Keratinozyten (HaCaT = „*human adult low calcium temperature keratinocytes*“) für 6 h bzw. 24 h mit 0,3 μ M GW501516 behandelt und anschließend das Expressionsverhalten mittels SYBR[®]-Green basierter qPCR (siehe Kapitel 2.1.5) analysiert.

Wie erwartet, wird das PPAR β Zielgen *ANGPTL4* bereits nach 6 h deutlich induziert (5,4-fach). Ein Effekt, der sich nach 24 h auf das 13,6-fache verstärkt (Abb. 3.7). Ähnlich wie bereits in NIH3T3 Zellen beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.3), wird die Expression von *PPARb* durch seinen Liganden GW501516 auch in HaCaT-Zellen induziert (1,5-fach nach 6 h und 3,4-fach nach 24 h). Das putative Zielgen *CDKN1C* zeigt dagegen nur eine frühe GW-abhängige Aktivierung nach 6 h (2-fach), die nach 24 h kaum noch nachzuweisen ist (1,2-fach). *CD36* wird in HaCaT-Zellen zwar exprimiert ($Ct^{CD36} = \sim 31$), zeigt in diesem Zelltyp im Gegensatz zum 3xFlag #1 allerdings keine GW-abhängige Regulation (Abb. 3.7). Die Expression von THBS2 wurde im humanen Zellsystem indes nicht untersucht.

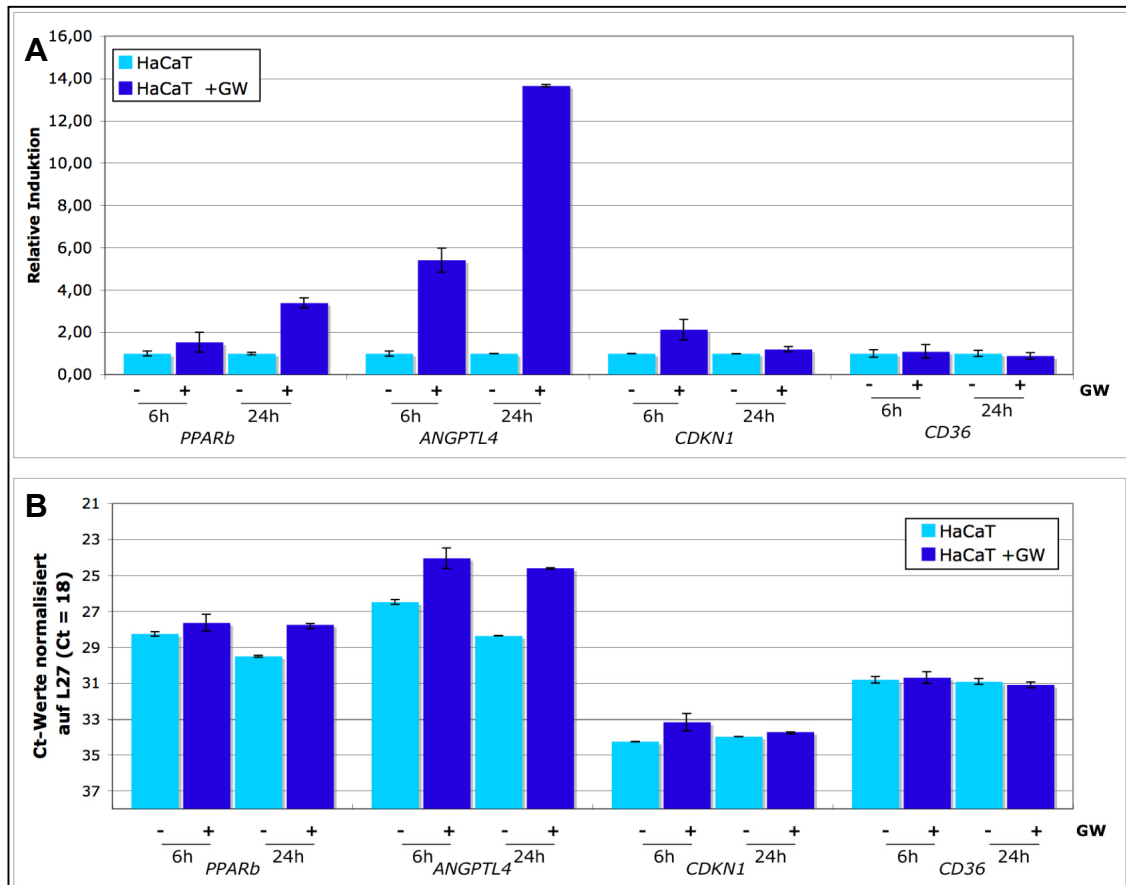


Abb. 3.7: Expression von PPARb- und potentiellen PPARβ Zielgenen in humanen Keratinozyten (HaCaT). HaCaT-Zellen wurden mit 0,3 μM GW501516 (GW) oder Lösungsmittel (DMSO) für 6 h bzw. 24 h behandelt. RNA wurde isoliert und nach cDNA Synthese mittels komparativer qPCR analysiert. **A)** Dargestellt ist die relative Induktion bezogen auf die jeweils unstimulierten Proben (6 h = 1 bzw. 24 h = 1). Die Daten zeigen Mittelwerte aus Triplikaten (± Standardabweichung). **B)** Durchschnitts-Ct-Werte (aus Triplikaten) normalisiert auf *RPL27* (Ct = 18) ± Standardabweichung. Expression von *PPARb* sowie der putativen Zielgene *CDKN1C* und *CD36*. *ANGPTL4* diente als Positivkontrolle.

3.2.4 Validierung potentieller PPARβ Zielgene: Zusammenfassung

Mittels *Microarray-Analyse* von *Matrigel-Plug Assay* Proben (siehe Kapitel 3.2.1) und dem Vergleich von Proteinprofilen aus *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Fibroblasten (siehe Kapitel 3.2.2) konnten neue potentielle PPARβ Zielgene identifiziert werden, die eine mögliche Rolle in der Zellproliferation, Tumorigenese und oder Angiogenese spielen. In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Expressionsdaten für einen Teil dieser Zielgene nach Analyse ihrer PPARβ-abhängige Regulation in unterschiedlichen zellulären Testsystemen vorgestellt. Tabelle 3.3 zeigt eine Gesamtübersicht mit den relativen Expressionen aller untersuchten Gene in den verschiedenen zellulären Systemen. Allgemein lässt sich festhalten, dass für alle neuen Zielgene eine PPARβ-abhängige

Regulation, sei es nach PPAR β -spezifischer Liganden Behandlung oder in direkter Abhängigkeit von der PPAR β -Expression, nachgewiesen werden konnte. Auch für PPAR α und PPAR γ konnten PPAR β -abhängige Regulationen beobachtet werden, wobei es zu keiner direkten Kompensation nach PPAR β -Knockout oder -Knockdown kommt. Auffallend war zudem, wie unterschiedlich die bereits etablierten PPAR β Zielgene (*Adrp*, *Angptl4*, *Cpt1a* und *Pdk4*) in den verschiedenen Systemen reagieren. Dementsprechend zeigen auch die potentiell neuen Zielgene deutliche Zelltyp-spezifische und zeitlich-bedingte Unterschiede in der PPAR β -abhängigen Regulation. Zudem konnten auch Spezies-bedingte Unterschiede beobachtet werden.

Ob es sich bei den auftretenden Effekten um eine direkte oder indirekte PPAR β -abhängige Regulation der Zielgene handelt kann aufgrund der beobachteten Regulationen der PPAR- und RXR-Subtypen mit diesen Ansätzen nicht abschließend geklärt werden.

Um jedoch weitere Beweise für das PPAR β -abhängige Einwirken einzelner Zielgene auf den hyperplastischen Phänotyp in den *Pparb*^{-/-} Endothelien zu erhalten, sollte in einem funktionalen Ansatz der Einfluss des Zellzyklusinhibitors p57^{Kip2} (*Cdkn1c*) näher analysiert werden.

Tabelle 3.3: Gesamtübersicht über die Expression von potentiellen PPAR β Zielgenen sowie PPAR- und RXR-Subtypen in verschiedenen zellulären *in vitro* Testsystemen. Zellen wurden für die angegebene Zeit mit der angegebenen Konzentration des PPAR β -spezifischen Liganden GW501516 inkubiert. Anschließend wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression mittels komparativer qPCR analysiert. Dargestellt ist die relative Expression aller mittels qPCR untersuchten Gene in den unterschiedlichen zellulären Testsystemen. Expression jeweils relativ zu den unstimulierten Wildtyp bzw. 3xFlag-PPar β rescue Zellen (# = 100 %). Zusätzlich sind für diese Proben die Ct-Werte (normalisiert auf *Rplp0* (nur Flox-Cre) Ct = 18) angegeben.

Zellsystem	1a			1b			2			3a			3b			4		
	PPar β Knockdown (NIH3T3); 0,3 μ M GW; 6h	siPpar β	siKontrolle (wt)	PPar β Knockdown (NIH3T3); 0,3 μ M GW; 24h	siPpar β	siKontrolle (wt)	Flox-Cre Knockout 48h	Flox (wt)	Cre	Flag-PPar β rescue #1; 1 μ M GW; 48h	pLPCX #2	3xFlag #1 ("wt")	Flag-PPar β rescue #3; 0,3 μ M; 6h	pLPCX #2	3xFlag #3 ("wt")	HaCat 0,3 μ M GW	6h	24h
Gennamen	--	GW	-- (#)	GW	-- (#)	GW	--	(#)		--	GW	-- (#)	GW	--	GW	-- (#)	GW	
<i>Ppara</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.		146,1%	126,1%	Ct = 30,41	n. n.	n. n.	n. n.	Ct = 26,54	103,0%	Ct = 27,98
<i>Pparb</i>	45,3%	51,4%	Ct = 31,41	162,0%	31,6%	21,7%	Ct = 33,84	181,0%	28,0%	Ct = 26,35	n. n.	Ct = 19,73	65,0%	n. n.	Ct = 19,27	123,2%	Ct = 28,26	144,0%
<i>Pparg</i>	n. n.	n. n.	n. n.	99,7%	99,7%	116,2%	Ct = 37,42	261,5%	49,8%	Ct = 28,07	25,3%	Ct = 25,65	62,4%	n. n.	n. n.	Ct = 28,11	109,0%	Ct = 28,49
<i>Rxra</i>	278,0%	285,0%	Ct = 31,44	121,0%	92,6%	38,3%	Ct = 29,37	132,0%	46,2%	Ct = 25,02	34,8%	Ct = 24,16	89,6%	20,0%	38,1%	Ct = 25,9	59,6%	Ct = 27,25
<i>Rxrb</i>	170,0%	175,0%	Ct = 27,74	123,0%	105,2%	24,7%	Ct = 27,85	143,3%	52,1%	Ct = 24,93	77,9%	Ct = 20,64	91,2%	57,1%	76,1%	Ct = 26,52	106,1%	Ct = 29,26
<i>Rxrg</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	112,0%	Ct = 30,65	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Ct = 31,77	137,0%	Ct = 33,83
<i>Adip</i>	157,0%	187,0%	Ct = 24,82	166,0%	79,2%	13,5%	Ct = 25,15	179,2%	68,4%	Ct = 20,97	68,9%	Ct = 22,25	327,2%	52,8%	67,9%	Ct = 21,2	360,4%	Ct = 28,25
<i>Angptl4</i>	343,0%	677,0%	Ct = 29,23	545,0%	189,0%	113,0%	Ct = 27,13	1500,0%	89,3%	Ct = 26,49	141,0%	Ct = 25,02	4220,0%	119,0%	136,0%	Ct = 23,18	1220,0%	Ct = 28,36
<i>Cpt1a</i>	96,9%	88,5%	Ct = 33,32	348,0%	72,4%	9,8%	Ct = 35,05	711,1%	55,2%	Ct = 30,75	286,9%	Ct = 26,59	547,6%	112,0%	64,6	Ct = 36,83	170,0%	Ct = 28,52
<i>Pdk4</i>	89,9%	120,9%	Ct = 32,52	394,3%	45,9%	135,4%	Ct = 31,08	690,1%	15,5%	Ct = 38,95	n. n.	Ct = 29,24	1293,9%	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Cd36</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	37,0%	45,2%	Ct = 36,04	5222,2%	n. n.	n. n.	Ct = 30,81	109,0%	Ct = 30,91
<i>Cdkn1c</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	27,4%	Ct = 26,89	53,3%	Ct = 23,13	54,5%	3,9%	4,5%	Ct = 29,28	86,1%	Ct = 33,97
<i>Clic1</i>	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	98,1%	41,2%	Ct = 20,21	99,0%	104,0%	Ct = 20	74,5%	Ct = 20,19	75,7%	n. n.	n. n.	Ct = 18,41	97,0%	Ct = 19,14
<i>Clic4</i>	145,0%	183,0%	Ct = 30,21	112,0%	81,0%	13,3%	Ct = 27,44	160,2%	94,5%	Ct = 22,09	238,2%	Ct = 27,96	128,1%	74,9%	75,3%	Ct = 21,51	109,0%	Ct = 28,11
<i>Fabp4</i>	76,7%	81,8%	Ct = 28,37	114,0%	114,2%	123,2%	Ct = 29,58	191,4%	328,0%	Ct = 27,61	8,9%	Ct = 24,22	960,0%	12,1%	10,1%	Ct = 26,21	139,4%	Ct = 29,31
<i>Igf1bp3</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	32,1%	Ct = 24,38	307,9%	Ct = 31,28	48,0%	2741,0%	4442,0%	Ct = 37,43	68,0%	n. u.
<i>Rbp1</i>	120,0%	112,0%	Ct = 26,1	120,0%	63,8%	55,7%	Ct = 23,18	95,2%	72,1%	Ct = 25,05	17,8%	Ct = 20,58	73,6%	22,9%	23,7%	Ct = 19,27	102,0%	Ct = 34,27
<i>Thbs2</i>	70,2%	76,2%	Ct = 34,4	128,0%	27,7%	n. n.	Ct = 36,46	104,7%	18,4%	Ct = 35,83	n. n.	Ct = 30,82	98,2%	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. u.
Darstellung: Expression in [%] relativ zur unbehandelten wt- bzw. rescue-Probe (# = 100%)																		
n. n. = nicht nachweisbar																		
n. u. = nicht untersucht																		
n. q. = nicht quantifizierbar																		

3.2.5 Funktionelle Analyse des putativen PPAR β Zielgens Cdkn1c (p57^{KIP2})

Wie in der Einleitung (vgl. Kapitel 1.2.8.3) bereits dargestellt, kommt es in einem PPAR β -abhängigen, syngenem Maustumormodell zur Tumorregression in *Pparb* defizienten Mäusen. Diese wird hervorgerufen durch einen hyperplastischen Phänotyp des Tumorendothels, das dadurch seine Funktionalität verliert. So kommt es zur Mangelversorgung des Tumorgewebes und damit zur Tumorregression. Dieser Phänotyp konnte in den gleichen Mäusen auch durch einen alternativen Angiogenese-Assay mittels Matrigel-Plugs gezeigt werden. Durch die retrovirale Reexpression von PPAR β in einem genetischen *in vivo rescue*-Ansatz konnten dagegen ein normaler Phänotyp der Tumorendothelien und funktionsfähige Gefäße wieder hergestellt werden. Die für den hyperplastischen Phänotyp potentiell verantwortlichen und durch PPAR β regulierten Gene wurden mittels *Microarray-Analyse* mit Hilfe der aus Matrigel-Plugs gewonnenen *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Endothelzellen identifiziert (siehe Kapitel 3.2.1). Aufgrund der bei einer Hyperplasie beobachteten vermehrten Zellproliferation ist in diesem Zusammenhang das Gen *Cdkn1c*, welches für den Zellzyklusinhibitor p57^{KIP2} codiert (Lee *et al.*, 1995), besonders interessant. *Cdkn1c* zeigte im *Microarray* eine 1,7-fach höhere Expression in *Pparb*^{+/+} Endothelien im Vergleich zu den *Pparb*^{-/-}-Pendants (vgl. Kapitel 3.1.2). Die weitere Validierung in den unterschiedlichen Testsystemen konnte die PPAR β -Abhängigkeit eindeutig bestätigen. So zeigt sich eine klar niedrigere Expression im konditionalen Cre-Knockout (vgl. Kapitel 3.2.3.2) und eine deutlich höher Expression in beiden 3xFlag-*Pparb rescue* Klonen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (vgl. Kapitel 3.2.3.3). Zudem konnte nach 6 h eine 2-fache GW-abhängige Induktion des Gens in humanen Keratinozyten beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.2.3.4) Ähnlich frühe Effekte konnten auch in humanen Endothelzellen (HuVECs ; „*Human umbilical vein endothelial cells*“) gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob der in den Wildtyp Matrigel- und Tumorendothelzellen zu beobachtende, wachstumsinhibitorische Effekt von PPAR β (siehe Kapitel 1.2.8.3) auch in anderen Zellsystemen nachweisbar ist, wurden Wachstumskurven mit dem im Rahmen des genetischen *rescues* etablierten Fibroblastenzelllinien durchgeführt.

3.2.5.1 3xFLAG-PPAR β Reexpression in A1 *Pparb*^{-/-} Fibroblasten führt zu einer verminderten Zellproliferation

Bei der Kultivierung der mittels genetischen *rescues* etablierten Zelllinien fiel auf, dass die 3xFlag-Pparb reexprimierenden Zellen im Vergleich zu dem pLPCX Kontroll-Klon deutlich langsamer wuchsen. Zudem wurde bei dem in regelmäßigen Abständen durchgeführten FLAG-spezifischen Immunfluoreszenzen des 3xFlag-Pparb #1 deutlich, dass mit zunehmender Passage für immer weniger Zellen positive FLAG Signale nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Um dies genauer zu analysieren, wurden daher Wachstumskurven von pLPCX #L2 Knockout-Zellen und 3xFlag-Pparb #1 Zellen aus unterschiedlich hohen Passagen (p +13 bzw. Subzelllinie p +24) erstellt (Abb. 3.8).

Um die etwaigen Zusammenhänge zwischen der *Pparb* Expression, Wachstumsverhalten und der *Cdkn1c*-Expression näher zu untersuchen, wurde parallel zu den Wachstumskurven RNA aus den entsprechenden (Sub-) Zelllinien isoliert und die Expression der entsprechenden Gene mittels qPCR analysiert (siehe Abb. 3.9). Als Positivkontrolle wurde zudem die Expression des PPAR β Zielgens *Angptl4* untersucht.

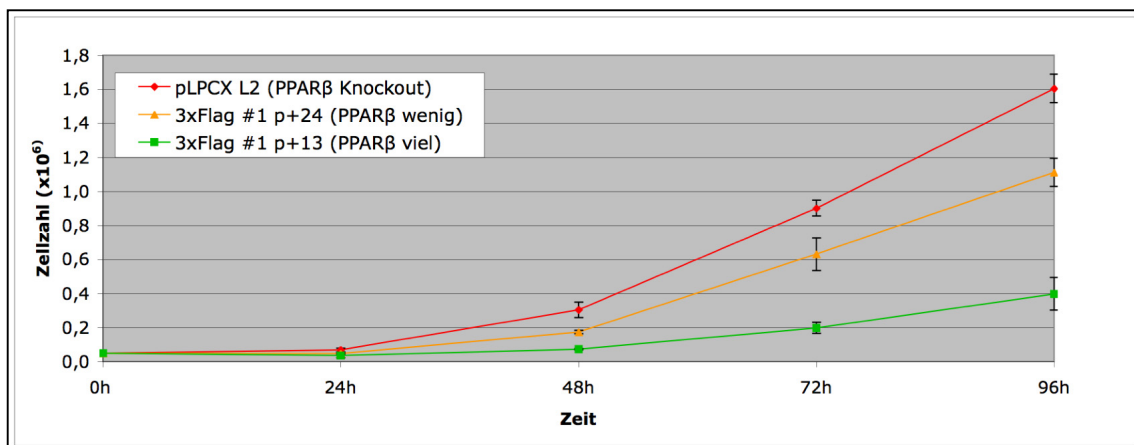


Abb. 3.8: PPAR β -abhängige Wachstumsinhibition in 3xFlag-Pparb #1 Fibroblasten. Wachstumskurven von 3xFlag-Pparb #1 Zellen in unterschiedlich hohen Passagen (p +13 bzw. p +24) und pLPCX #L2 Knockout-Zellen. Jeweils 50000 Zellen wurden in 6'well Platten ausplattiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der absoluten Zellzahl (in Triplikaten) im 24 h Rhythmus über 4 Tage. Die Daten repräsentieren Durchschnittswerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung.

Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, zeigen sich deutliche Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den Zellen des 3xFlag-Pparb #1 und der pLPCX-Kontrolle. Durch die PPAR β -abhängige Wachstumsinhibition in den 3xFlag-Pparb #1 Fibroblasten kommt es daher zu einem negativen Selektionsdruck gegen die PPAR β Expression. Folglich nimmt die *Pparb*-Expression mit zunehmender Passage im #1 ab

und die Proliferationsrate weiter zu. Die Analyse der dazu gehörigen Expressionsdaten (Abb. 3.9) bestätigt diese Korrelation zwischen *Pparb*-Expression und Wachstumsgeschwindigkeit. So zeigt der *Pparb* Knockout-Klon (pLPCX) die höchste Proliferationsrate. Die Zellen des 3xFlag-Pparb #1 in hoher Passage (p +24) wachsen zudem deutlich schneller im Vergleich zu den Zellen in niedrigerer Passage (p +13). Passend dazu ist für die Subzelllinie (p +24) eine deutlich geringere *Pparb*-Expression nachweisbar als in der Ursprungszelllinie (p +13).

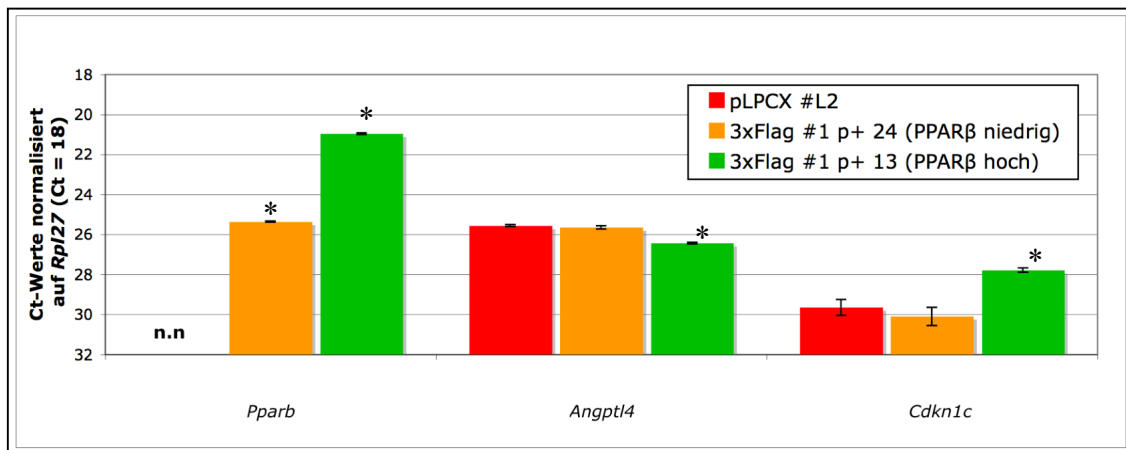


Abb. 3.9: Expression von *Pparb*, *Cdkn1c* und *Angptl4* in unterschiedlichen Passagen des 3xFlag-Pparb #1 und pLPCX #L2. Aus Zellen mit unterschiedlich hohen Passagen des 3xFlag-Pparb #1 (p +13 bzw. p +24) und des Kontroll-Klons pLPCX #L2 wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels qPCR analysiert. Dargestellt sind Durchschnitts-Ct-Werte (Triplikate \pm Standardabweichung), normalisiert auf *Rpl27* (Ct = 18). Expressionsdaten für die Gene *Pparb*, *Angptl4* und *Cdkn1c* (n. n.: Expression nicht nachweisbar). * Signifikante Unterschiede zum pLPCX #L2 Knockout-Klon ($p > 0,01$; zweiseitiger Students *t*-Test, gleicher Varianz).

Ähnlich wie die Wachstumsgeschwindigkeit korreliert auch die Expression von *Cdkn1c* mit der Expression von *Pparb* in den verschiedenen (Sub-) Zelllinien. So zeigt der 3xFlag #1 p +24 eine vergleichbar geringe *Cdkn1c*-Expression wie der pLPCX Klon. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch für das *Angptl4*-Gen. Genau wie im pLPCX #L2 kommt es auch im 3xFlag-Pparb #1 p+24 zu einer etwas höheren Expression (ca. 1,7-fach) im Vergleich zur niedrigeren Passage (p +13). Dieses Verhalten wurde zuvor bereits im 3xFlag-Pparb #1 (Abb. 3.6) und #3 (siehe Tabelle 3.3) im Vergleich zum pLPCX #L2 beobachtet und untermauert damit diese Ergebnisse.

Um in einem funktionalen Ansatz das Zusammenspiel zwischen PPAR β und p57^{KIP2} weiter zu untersuchen, sollte der Einfluss der *Cdkn1c*-Expression auf die Proliferation der 3xFLAG-PPAR β exprimierenden Zellen näher analysiert werden.

3.2.5.2 siRNA-vermittelter Cdkn1c Knockdown vermindert den Selektionsdruck auf 3xFLAG-PPAR β exprimierende A1 *Pparb*^{-/-} Fibroblasten

Durch die Analysen von Wachstumskurven konnte gezeigt werden, dass die Reexpression von PPAR β einen deutlichen wachstumsinhibitorischen Effekt auf die Proliferation von *Pparb*^{-/-} Fibroblasten hat (Abb. 3.8). Dabei korreliert die Expression des Zellzyklusinhibitors p57^{KIP2} mit der *Pparb*-Expression. Es kommt zu einem negativen Selektionsdruck auf die 3xFLAG-PPAR β exprimierenden Zellen, was im Laufe der Kultivierung zu einer kontinuierlichen Abnahme dieser Zellen führt.

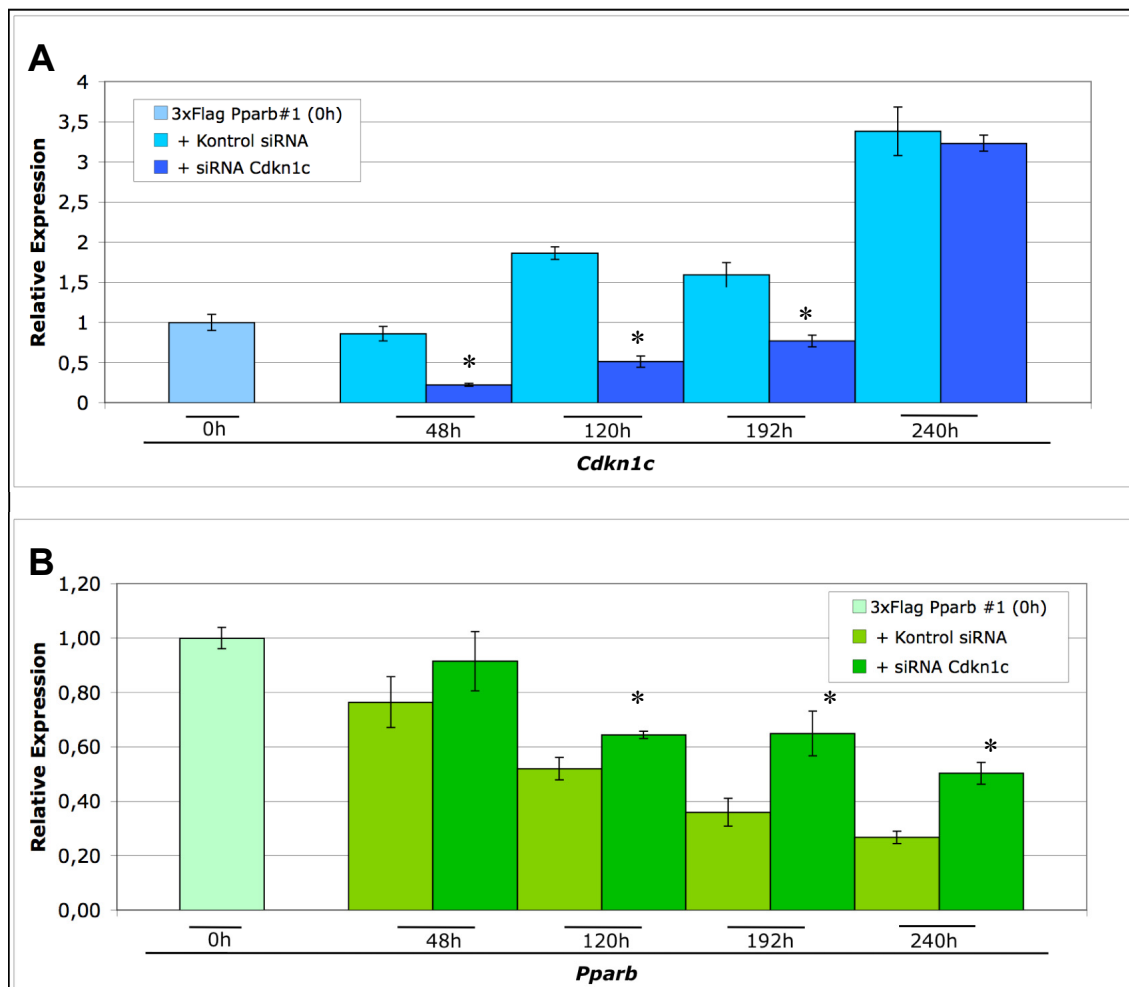


Abb. 3.10: Auswirkungen des Cdkn1c Knockdowns auf den wachstumsinhibierenden Effekt von PPAR β in 3xFlag Pparb #1 Zellen. 3xFlag-Pparb #1 Zellen wurden dreimal mit Cdkn1c siRNA transfiziert und jeweils 48 h nach dem Knockdown (48 h, 120 h; 192 h) sowie zu Beginn (0 h) und am Ende des Experiments (240 h) wurde RNA isoliert. Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf des Experiments gibt Abb. 2.1. Nach der cDNA Synthese erfolgte die Analyse der Proben mittels komparativer qPCR. Dargestellt ist jeweils die relative Expression (Triplikate \pm Standardabweichung) im Vergleich zur Ausgangsexpression zum Zeitpunkt 0 h (0 h = 1). **A)** Validierung des siRNA-vermittelten *Cdkn1c* Knockdowns. **B)** Abnahme der *Pparb*-Expression in Folge der Kultivierung der Zellen in Abhängigkeit vom *Cdkn1c* Knockdown. * Signifikante Unterschiede zur mit Kontroll-siRNA behandelten Probe ($p > 0,01$; zweiseitiger Students *t*-Test, gleicher Varianz).

Um den funktionalen Zusammenhang zwischen *Cdkn1c*-Expression und der Wachstumsinhibition der 3xFLAG-PPAR β exprimierenden Zellen zu zeigen, sollte durch siRNA Knockdown von *Cdkn1c* dem negativen Selektionsdruck auf die *Pparb* exprimierenden Zellen entgegengewirkt werden. Die dadurch zu erwartende höhere Proliferationsrate der FLAG-positiven Zellen sollte sich wiederum indirekt durch eine verminderte Abnahme in der (*Flag*-)*Pparb*-Expression im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen äußern. Als Grundlage für diesen Ansatz diente der 3xFlag-Pparb #1, in dem nach mehreren Passagen die Anzahl FLAG-PPAR β exprimierender Zellen bereits stark reduziert war (ca. 30 % positive Zellen: FLAG-Immunfluoreszenz; Daten nicht gezeigt). Um die Unterschiede deutlich sichtbar zu machen, erfolgte eine Kultivierung der Zellen über mehrere Passagen mit insgesamt drei zyklischen *Cdkn1c* Knockdowns. Alle 72 h erfolgte eine Behandlung mit siRNA analog den siRNA Behandlungen wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Eine detaillierte Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Experiments gibt Abb. 2.1.

Neben der Validierung des *Cdkn1c* Knockdowns erfolgte auch die Analyse der *Pparb*-Expression jeweils 48 h nach einer siRNA Transfektion, zudem erfolgte die abschließende Bestimmung 10 Tage nach der ersten Transfektion.

Wie die Validierung des *Cdkn1c* Knockdowns auf mRNA Level zeigt (Abb. 3.10.A), kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Expression nach den jeweiligen *Cdkn1c* siRNA Transfektionen (48 h = 74 %, 120 h = 72 % bzw. 52 % nach 192 h) im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Der zu beobachtende Anstieg der *Cdkn1c*-Expression nach 120 h, 192 h und vor allem nach 240 h sowohl in den Kontroll-siRNA als auch in den mit *Cdkn1c*-spezifischer siRNA behandelten Zellen erklärt sich wahrscheinlich aus der Tatsache, dass es sich bei *Cdkn1c* um ein durch Zelldichte induziertes Gen handelt (Samuelsson *et al.*, 1999).

Wie erwartet, zeigen die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine schnelle Abnahme der *Pparb*-Expression (Abb. 3.10.B: 76 % nach 48 h, 52 % nach 120 h, 36 % nach 192 h und 27 % nach 240 h). Dies bestätigt erneut den gegen die PPAR β exprimierenden Zellen bestehenden Selektionsdruck. Im Gegensatz dazu kann man bei den mit *Cdkn1c* siRNA behandelten Zellen eine deutlich geringere Abnahme in der *Pparb*-Expression (92 % nach 48 h, jeweils 65 % nach 120 h und 192 h sowie 50 % nach 240 h) feststellen. Der klare Verlust der *Pparb*-Expression in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen und die Aufhebung dieses Verlustes durch die *Cdkn1c*

siRNA Behandlung ist ein deutliches Indiz dafür, dass die PPAR β -abhängige Inhibition der Zellproliferation durch die erhöhte Expression von *Cdkn1c* hervorgerufen wird.

In den vorangegangenen Kapiteln konnte die PPAR β -abhängige Regulation potentieller Zielgene in verschiedenen zellulären Testsystemen nachgewiesen werden. Für *Cdkn1c* konnte zudem in funktionellen Untersuchungen ein direkter Zusammenhang zwischen PPAR β -vermittelter Wachstumsinhibition und *Cdkn1c*-Expression aufgezeigt werden. Um zu verstehen, wie die PPAR β -abhängige Regulation vermittelt wird, ist es wichtig das Zusammenspiel zwischen Liganden, Liganden-spezifischer Transportproteine und Aktivierung des Rezeptors, aber auch möglichen Modifikationen am Rezeptor selbst zu verstehen. Im zweiten und dritten Teil dieser Arbeit sollten diese Vorgänge daher näher untersucht werden.

3.3 Regulation von PPAR β durch natürliche und synthetische Liganden

PPARs dienen in der Zelle als Lipidsensoren, die nahrungsbedingte Veränderungen im Lipid- und Fettsäurespiegel in metabolische Aktivität umsetzen. Natürlicherweise werden sie entsprechend ihrer Funktion durch ungesättigte Fettsäuren (z. B. Arachidonsäure) und deren Derivate aktiviert.

Die Frage nach einem natürlichen, hochaffinen und PPAR β -spezifischen Liganden konnte bislang jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden. Der Vitamin A Metabolit *all-trans* Retinsäure (*atRA*) wurde u. a. als physiologischer Ligand beschrieben (Shaw *et al.*, 2003). *atRA* galt bis dahin vornehmlich als Ligand für die Retinsäurerezeptoren (RAR). Schug und Kollegen beschrieben kürzlich (2007) einen Mechanismus, wie *atRA* entweder RAR oder PPAR β aktivieren kann. Entscheidend dafür ist demnach das Verhältnis von FABP5 zu CRABP2, zwei kleine Fettsäure-bindende Proteine, die zur Familie der intrazellulären Lipid-bindenden Proteine (iLBP) gehören. Diese sind beide in der Lage, Retinsäuren zu binden und transportieren diese direkt zu ihren spezifischen Kernrezeptoren. Ist das Verhältnis von CRABP2 zu FABP5 hoch (CRABP2 > FABP5), kommt es demnach zur Aktivierung der RAR Rezeptoren, ist das Verhältnis jedoch andersherum (FABP5 > CRABP2), gelangt *atRA* über FABP5 zu PPAR β .

Neben diesem potentiellen natürlichen Liganden gibt es inzwischen aber auch eine

ganze Reihe synthetischer, hochaffiner und PPAR β -spezifischer Liganden wie z. B. GW501516 und L165,041.

In einem ersten Schritt sollten daher verschiedene etablierte und neu beschriebene PPAR β Liganden in Bezug auf ihre Transaktivierung in einem zellulären Reporterassay verglichen werden.

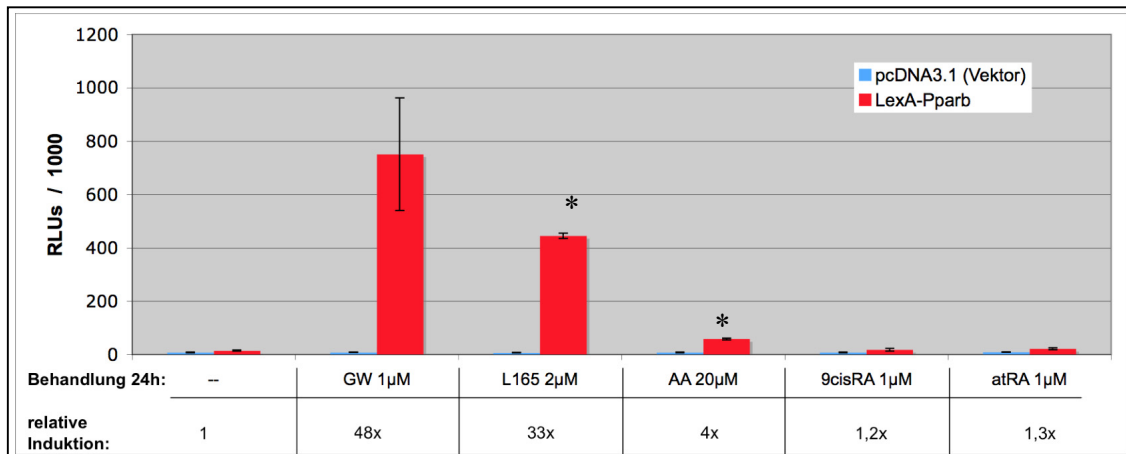


Abb. 3.11: Vergleich der Transaktivierung von LexA-PPAR β durch verschiedene Liganden. NIH3T3 Zellen wurden mit einem Luziferase-gekoppelten Reporterplasmid (7L-TATAi) und 10 ng Leervektor (pcDNA3.1) oder 10 ng Expressionsplasmid (pcDNA3.1-LexA-Pparb-LBD) transfiziert. Es folgte eine Behandlung mit verschiedenen Liganden für 24 h, anschließend wurde die Transaktivierung in einem „Luziferaseassay“ gemessen. Dargestellt sind „Relative Light Units“ (RLUs). Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. Die Werte der sich daraus ergebenden relativen Induktion zur unbehandelten Probe sind angegeben (Werte normalisiert auf den Leervektor). Liganden: *GW*: GW501516 1 μ M; *L165*: L165,041 μ M; *AA*: Arachidonsäure 20 μ M; *9cisRA*: 9cis-Retinsäure 1 μ M; *atRA*: all-trans Retinsäure 1 μ M. *Signifikante Unterschiede zur unstimulierten Probe ($p < 0,01$ zweiseitiger Students *t*-Test, gleicher Varianz).

Dazu wurden NIH3T3 Zellen mit einem Luziferase-gekoppelten Reporterplasmid (7L-TATAi) und zusätzlich entweder mit Leervektor (pcDNA3.1) oder einem Fusionsprotein aus bakterieller LexA-DNA-Bindedomäne und PPAR β -Ligandenbindedomäne (pcDNA3.1.-LexA-Pparb) transient transfiziert (vgl.2.4.1). Es folgte eine Behandlung der Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Liganden und danach die Quantifizierung der PPAR β -spezifischen Transaktivierung anhand eines „Luziferaseassays“ (siehe Kapitel 2.4). Wie zu erwarten, zeigen beide synthetischen Liganden eine starke Transaktivierung, die aufgrund der höheren Affinität von GW501516 nochmals deutlich stärker (47-fach) ausfällt als für L165,041 (33-fach). Die natürlich vorkommende Arachidonsäure aktiviert den Reporter dagegen lediglich 4-fach. Überraschenderweise zeigt *atRA* vergleichbar, mit dem als Negativkontrolle

mitgeführten RXR Liganden *9cisRA* (*9cis*-Retinsäure), keine signifikante Aktivierung (1,3-fach) des Reporters (Abb. 3.11).

Die fehlende Aktivierung durch *atRA* steht im direkten Widerspruch zu den von Shaw *et al.*, 2003 und Schug *et al.*, 2007 publizierten Daten, daher wurde die Rolle von *atRA* als möglicher PPAR β Ligand in weiterführenden Experimenten näher untersucht.

3.3.1 *all-trans* Retinsäure (*atRA*) ist kein natürlicher Ligand für PPAR β *in vitro*

Die postulierte Rolle von *atRA* als natürlicher Ligand für PPAR β ist abhängig von dem Verhältnis der beiden Lipid-bindenden Proteine FABP5 und CRABP2. Nur wenn FABP5 in größeren Mengen als CRABP2 vorliegt kommt es demnach zum Transport von *atRA* zu PPAR β und ermöglicht so dessen Aktivierung. Um auszuschließen, dass die fehlende Aktivierung des Reportes durch *atRA* in NIH3T3 Zellen auf eine zu geringe Expression an FABP5 im Vergleich zu CRABP2 zurückzuführen ist, wurden zunächst die basalen Expressionslevel der beiden Proteine mittels qPCR analysiert. Wie Abb. 3.12 zeigt, wird *Fabp5* deutlich stärker exprimiert (~ 10 Ct Werte) als *Crabp2*. Dies entspricht genau dem von Schug und Kollegen geforderten Verhältnis als Voraussetzung für die Aktivierung von PPAR β durch *atRA* (Schug *et al.*, 2007).

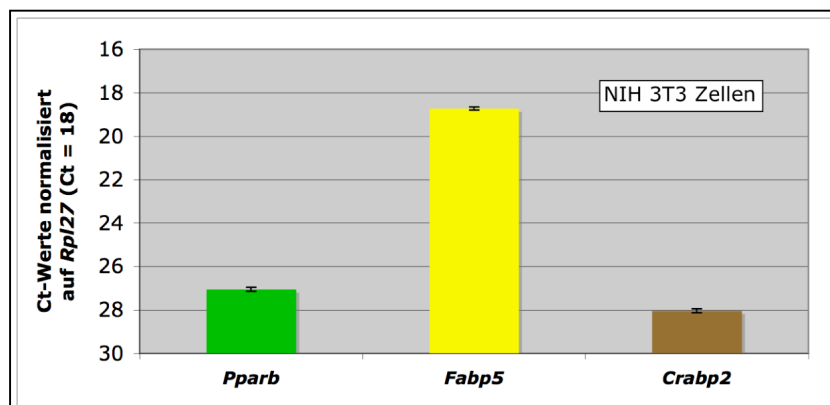


Abb. 3.12: Expressionsniveau von *Pparb*, *Fabp5* und *Crabp2* in NIH3T3 Zellen. Aus unbehandelten NIH3T3 Zellen wurde RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Dargestellt sind die Expressionslevel von *Pparb*, *Fabp5* und *Crabp2*. Durchschnitts-Ct-Werte (Triplikate \pm Standardabweichung) normalisiert auf *Rpl27* (Ct = 18).

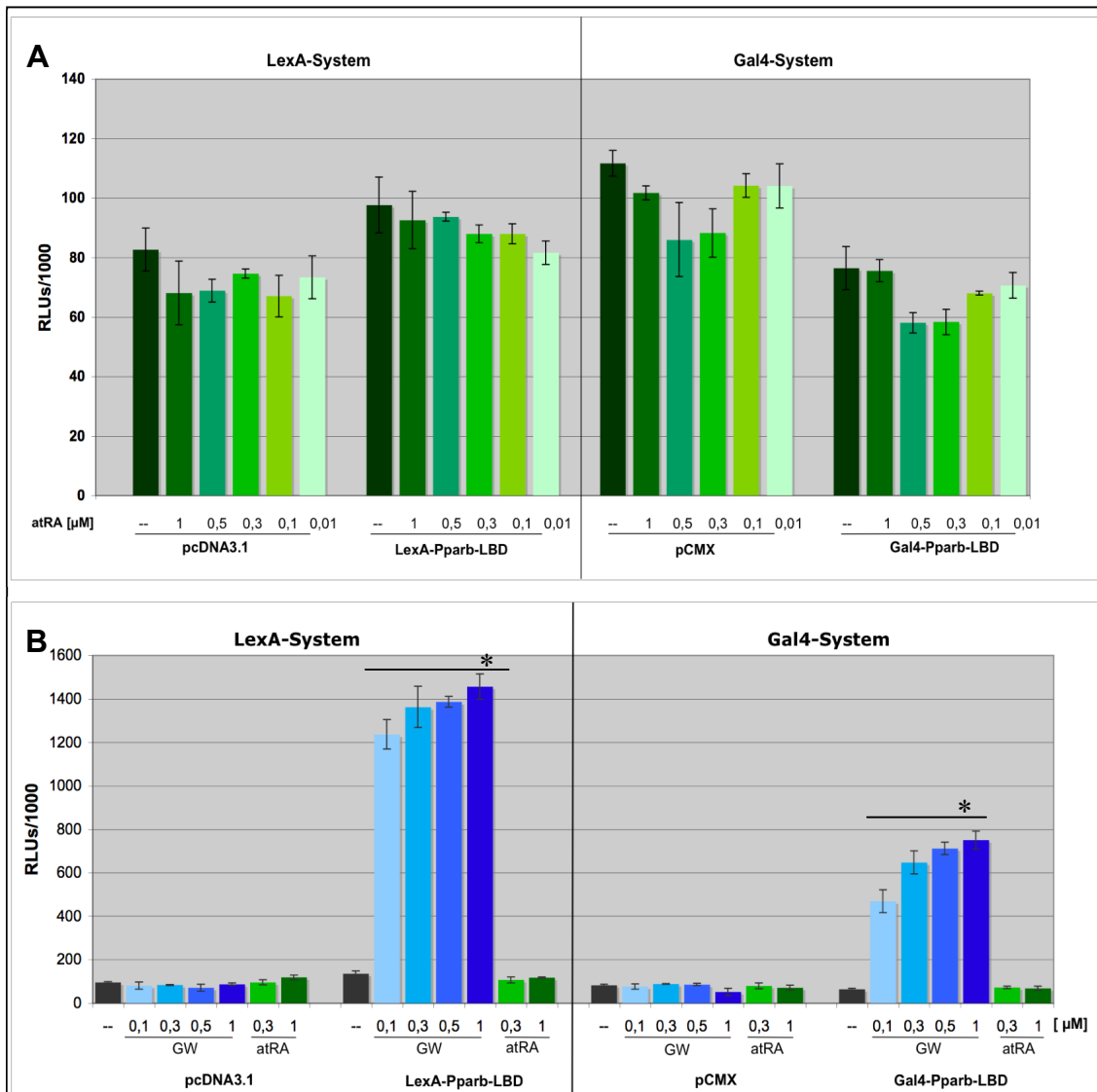


Abb. 3.13: All-trans Retinsäure (atRA) ist kein Ligand von PPAR β im LexA-System und Gal4-System. 3T3 Zellen wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen Luziferase-gekoppelten Reportersystemen (LexA bzw. Gal4) transfiziert. Dazu wurde entweder das Reporterplasmid 7L-TATAi mit 10 ng Leervektor (pcDNA3.1) bzw. 10 ng pcDNA3.1-LexA-Pparb-LBD transfiziert oder das Reporterplasmid 10xGalSV-GL3 mit 10 ng Leervektor (pCMX-empty) bzw. 10 ng pCMV-Gal4-Pparb-LBD. Es folgte eine Behandlung mit verschiedenen Liganden für 24 h, anschließend wurde die Transaktivierung in einem „Luziferaseassay“ gemessen. **A)** Titration von atRA (1 - 0,01 μ M). **B)** Titration von GW501516 (1 - 0,1 μ M). Zum Vergleich wurden die Zellen parallel mit 1 μ M bzw. 0,3 μ M atRA stimuliert. Dargestellt sind jeweils „Relative Light Units“ (RLUs). Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. *Signifikante Unterschiede zur unstimulierten Probe (p < 0,01 zweiseitiger Students t-Test, gleicher Varianz).

In einem weiteren Experiment sollte daher zunächst die Menge an atRA titriert und die Aktivierung in zwei unabhängigen, jedoch vergleichbaren Reportersystemen überprüft werden. Dazu wurde neben dem bereits beschriebenen LexA-Pparb System (siehe Kapitel 2.4.1) ein auf Gal4-DNA-Bindung beruhendes PPAR β -LBD Fusionsprotein (pCMX-Gal4-Pparb-LBD) mit entsprechendem Reporterplasmid

(10xGalSV-GL3) in NIH3T3 Zellen transfiziert (Gal4-System siehe Kapitel 2.4.2). Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen *atRA* Konzentrationen behandelt (Abb. 3.13.A) und die Transaktivierung des Reportergens im „*Luziferaseassay*“ analysiert. Um die Funktionalität beider Systeme zu zeigen, wurde in einem zweiten Ansatz eine GW501516 Titration durchgeführt und parallel dazu Zellen mit 0,3 bzw. 1 μ M *atRA* behandelt (Abb. 3.13.B). Obwohl sich beide Systeme durch GW501516 signifikant stimulieren lassen, führt die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen *atRA* Konzentrationen zu keinerlei spezifischer Transaktivierung. Die Funktionalität der für die Versuche eingesetzten *all-trans* Retinsäure konnte in einen RAR-spezifischen, kommerziellen *in vitro* Ligandenbindungsassay (Invitrogen) jedoch eindeutig nachgewiesen werden (Daten von Dr. Wolfgang Meißner, nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass eine *atRA*-spezifische PPAR β -Aktivierung aufgrund der eingesetzten artifiziellen Testsysteme nicht nachweisbar war, wurden die Versuche in einem dem von Schug und Kollegen vergleichbaren PPRE-gekoppelten Reportersystem (siehe Kapitel 2.4.3) durchgeführt. Um PPAR β -abhängige Effekte deutlich sichtbar zu machen, erfolgte die Transfektion des Reporterplasmids (3xPPRE-TATAi) entweder zusammen mit einem Expressionsplasmid für PPAR β (pCMX-mPparb), für RXR α (pSG5-hRXRa), beiden zusammen oder nur mit „Leervektor“ (pcDNA3.1) in etablierten A1 *Pparb*^{-/-} Lungenfibroblasten. Anschließend erfolgte neben der Behandlung der Zellen mit GW501516 (GW) und *atRA* auch eine Stimulation mit dem RXR Liganden *9cisRA* sowie eine Co-Stimulation mit GW und *9cisRA* für 24 h.

Bemerkenswerterweise kommt es trotz vergleichbarem Versuchsaufbau auch unter diesen Bedingungen zu keiner *atRA*-spezifischen Aktivierung des Luziferasereporters, wohingegen GW nach Co-Transfektion von PPAR β und RXR α zu einer signifikanten Induktion (3,7-fach) führt (Abb. 3.14). Die stärkste Transaktivierung erfolgt nach Co-Transfektion und Co-Stimulation von RXR α und PPAR β (5-fach). Vergleichbare Ergebnisse konnten zudem auch in NIH3T3 Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

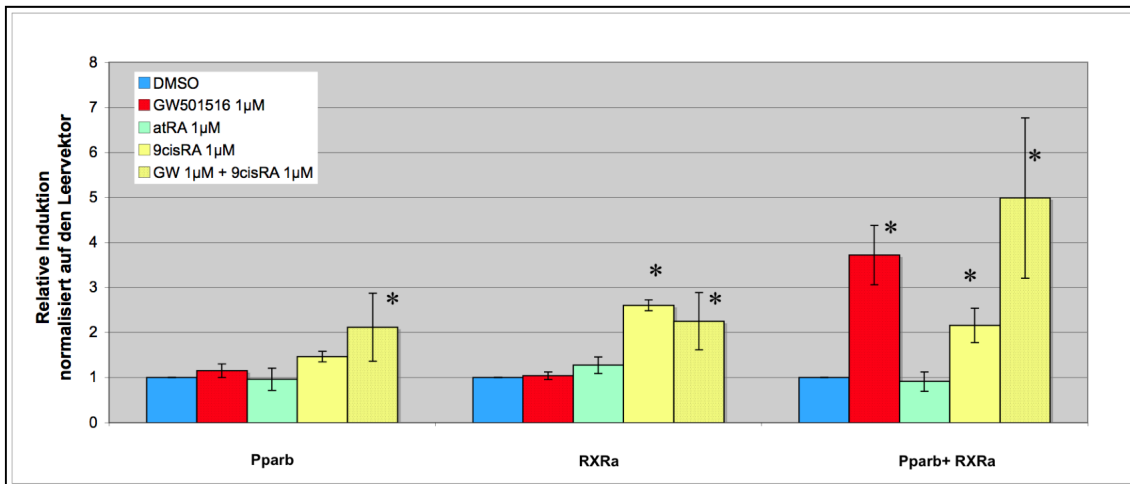


Abb. 3.14: All-trans Retinsäure (atRA) ist kein Ligand für PPARβ in einem PPARE-gekoppelten Reporterassay. A1 *Pparb*^{-/-} Fibroblasten wurden mit jeweils 4 μg PPARE-gekoppelten Reporterplasmid und zusätzlich mit entweder 10 ng pCMX-mPparb + 10 ng pcDNA3.1 (Pparb), oder mit 10 ng pSG5-hRXRa + 10 ng pcDNA3.1 (RXRa), mit jeweils Beiden zusammen (Pparb+RXRa) oder mit 20 ng pcDNA3.1 transfiziert. Die Ansätze wurden jeweils mit puc18 Plasmid auf 5 μg Gesamtplasmidmenge aufgefüllt. Es folgte eine Behandlung mit verschiedenen Liganden für 24 h, (DMSO: Lösungsmittel; GW: GW501516 1μM; atRA: all-trans Retinsäure 1μM; 9cisRA: 9cis-Retinsäure 1μM) anschließend wurde die Transaktivierung in einem „Luziferaseassay“ gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. Relative Induktion nach Normalisierung auf den Levektor (pcDNA3.1). Mittelwerte aus Triplikaten ± Standardabweichung. *Signifikante Unterschiede zur DMSO-behandelten Probe (p < 0,05 zweiseitiger Students *t*-Test, gleicher Varianz).

3.3.2 all-trans Retinsäure ist kein natürlicher Ligand für PPARβ in vivo

Um eventuelle Zelltyp und Spezies bedingte Unterschiede zwischen den Studien endgültig auszuschließen, sollte eine von Schug und Kollegen beschriebene atRA-spezifische Aktivierung der primären PPARβ Zielgene *ADRP* und *ANGPTL4* in humanen Keratinozyten (HaCaT) überprüft werden. Dazu wurden HaCaT Zellen für 4 h mit dem Lösungsmittel DMSO, GW501516 (GW), atRA und als zusätzliche Kontrollen mit 9cisRA bzw. 9cisRA + GW behandelt. Nach RNA Extraktion und cDNA Synthese wurde die Expression der verschiedenen Gene mittels komparativer qPCR analysiert (siehe Kapitel 2.1.5). Wie in Abb. 3.15.A dargestellt, entspricht das Expressionsniveau von *FABP5* und *CRABP2* dem von Schug *et al.* beschriebenen Verhältnis (*FABP5* > *CRABP2*). Um weiterhin die Funktionalität der eingesetzten Retinsäure zu zeigen, wurde die Expression des durch atRA induzierten *CYP26A1* Gens (Loudig *et al.*, 2000) analysiert. Demnach kommt es zu einer deutlichen Induktion (21-fach) des zur Familie der Cytochrom P450 metabolisierenden Enzyme gehörenden Gens, sowohl nach atRA als auch nach 9cisRA Behandlung. Auch *CRABP2* wird durch atRA (2-fach) und 9cisRA (3-fach) induziert. Wie erwartet, werden die beiden PPARβ Zielgene nach

Stimulation mit GW501516 deutlich induziert (*ADRP*: 13-fach; *ANGPTL4*: 7-fach). Zudem werden beide Gene auch nach Inkubation mit *9cisRA* (5-fach bzw. 5,5-fach), am stärksten aber nach Co-Stimulation durch *9cisRA* + GW induziert (30-fach bzw. 14-fach), ein Effekt, der vergleichbar auch schon im PPARE-gekoppelten Reporterassay (Abb. 3.14) gezeigt werden konnte. Auch *atRA* induziert unter diesen Bedingungen beide PPAR β Zielgene (2,5-fach bzw. 3,2-fach), jedoch ist diese Induktion schwächer als die mit *9cisRA* gezeigte.

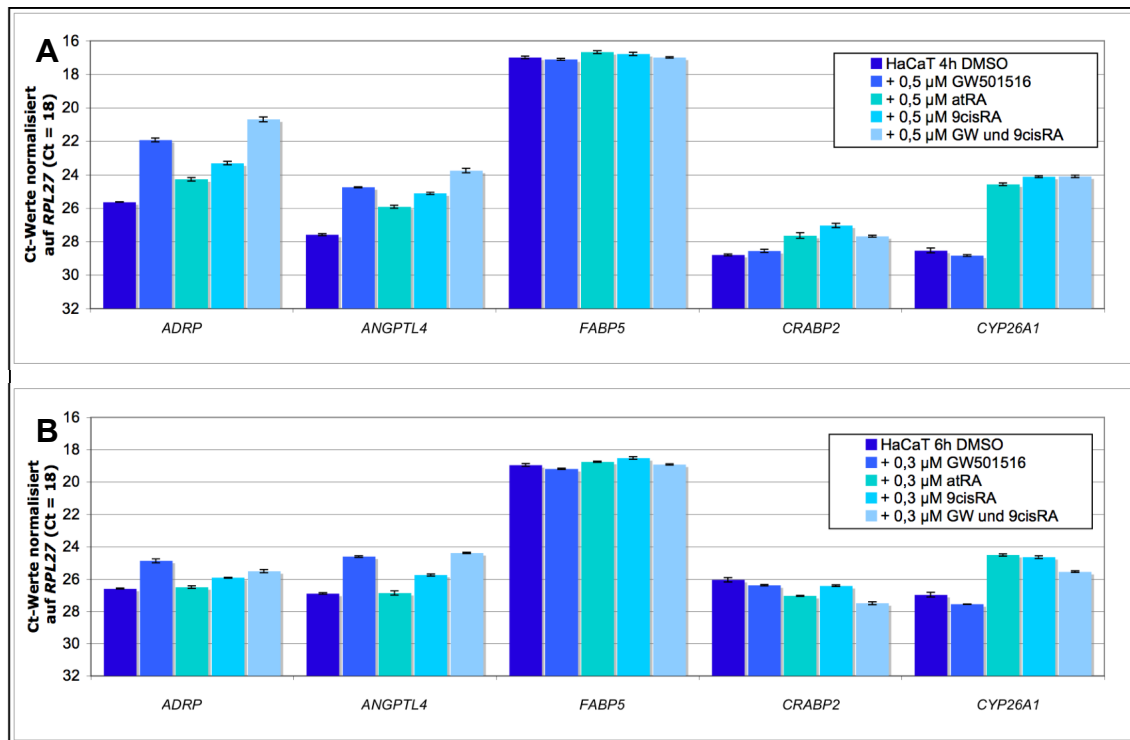


Abb. 3.15: Liganden-abhängige Induktion von PPAR β Zielgenen in humanen Keratinozyten (HaCaT). Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten für 4 h mit 0,5 μ M (A) bzw. für 6 h mit 0,3 μ M (B) DMSO, GW5011516 (GW), *atRA*, *9cisRA* oder GW + *9cisRA* behandelt. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels komparativer qPCR analysiert. Dargestellt sind Durchschnitts-Ct-Werte aus Triplikaten, normalisiert auf *RPL27* (Ct = 18) \pm Standardabweichung. Expression der PPAR β Zielgene *ADRP* und *ANGPTL4* sowie der Lipid-bindenden Proteine *FABP5* und *CRABP2*. *CYP26A1* diente als Positivkontrolle für die *atRA* Stimulation.

Produktionsbedingt enthält *atRA* immer eine Verunreinigung mit dem *9cis*-Isomer. Um also *atRA*-unspezifische Effekte auszuschließen, wurde das Experiment mit einer geringeren Ligandenkonzentrationen (0,3 μ M) wiederholt und die Inkubationszeit geringfügig auf 6 h verlängert (Abb. 3.15.B). Während *CYP26A1* auch unter diesen Bedingungen noch deutlich durch *atRA* und *9cisRA* induziert wird (\sim 5-fach), bleibt eine *atRA*-spezifische Induktion von *ADRP* und *ANGPTL4* aus. *9cisRA* vermag

dagegen immer noch beide Gene zu induzieren, wenn auch geringfügig schwächer (3,3-fach bzw. 4,9-fach).

Um in zusätzlichen, unabhängigen Zellkultursystemen zu überprüfen, ob die prognostizierte Rolle von *atRA* als direkter Ligand für PPAR β so nicht zutreffend ist, wurde eine mögliche *atRA*-abhängige Induktion der beiden Zielgene *Adrp* und *Angptl4* in weiteren etablierten PPAR β -abhängigen Zellkultursystemen (vgl. 3.2.3.1 und 3.2.3.3) analysiert.

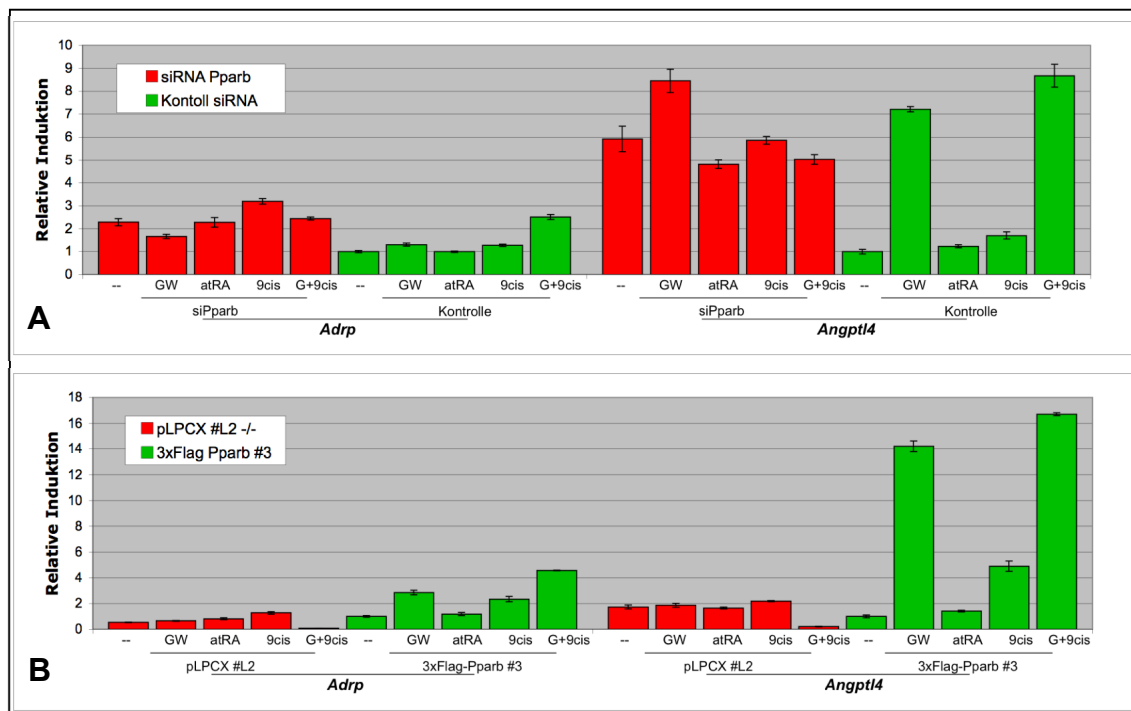


Abb. 3.16: PPAR β Zielgene zeigen keine *atRA*-abhängige Induktion in murinen Fibroblastenzelllinien. Die angegebenen Zelllinien wurden für 6 h mit 0,3 μ M der verschiedenen Liganden (DMSO, GW5011516 (GW), *atRA*, *9cisRA* oder GW + *9cisRA*) behandelt. RNA wurde isoliert und nach cDNA Synthese die Expression der PPAR β -Zielgene *Adrp* und *Angptl4* mittels komparativer qPCR analysiert. Dargestellt ist jeweils die relative Induktion (Triplikate \pm Standardabweichung) im Vergleich zur unstimulierten, mit Kontroll-siRNA behandelten Probe (A: Kontroll-siRNA = 1) bzw. zur unstimulierten 3xFlag-Pparb #3 Probe (B: 3xFlag-Pparb #3 = 1). **A)** NIH3T3 Zellen nach Pparb-spezifischem Knockdown (vgl.3.2.3.1). Durchschnitts-Ct-Wert für die unstimulierte mit Kontroll-siRNA behandelte Probe: Ct^{*Adrp*} = 23,92 und Ct^{*Angptl4*} = 26,25 (normalisiert auf *Rpl27* Ct = 18). **B)** Retroviral stabil transduzierte 3xFlag-Pparb #3 und pLPCX #L2 Kontrollzellen (vgl.3.2.3.3). Durchschnitts-Ct-Wert für die unstimuliert 3xFlag-Pparb #3 Probe: Ct^{*Adrp*} = 25,05 und Ct^{*Angptl4*} = 26,94 (normalisiert auf *Rpl27* Ct = 18).

Wie Abb. 3.16 zeigt, kommt es weder in den mit Pparb- oder Kontroll-siRNA behandelten NIH3T3 Zellen (A), noch in den 3xFlag-Pparb #3 oder den entsprechenden pLPCX #L2 Kontrollzellen (B) zu einer *atRA*-spezifischen Induktion von *Adrp* oder *Angptl4* nach 6-stündiger Stimulation. Wohingegen die Behandlung mit GW als auch

die Co-Stimulation durch GW und *9cisRA* zu teils deutlichen Induktionen im 3xFlag-Pparb #3 bzw. in den mit Kontroll-siRNA transfizierten NIH3T3 Zellen führt. Die auch hier wieder zu beobachtende verstärkte basale Expression der beiden Zielgene im Pparb-spezifischen Knockdown und auch im pLPCX Knockout-Klon konnte bereits in früheren Experimenten gezeigt werden (vgl. Abb. 3.3 und Abb. 3.6).

Zusammen zeigen diese Experimente eindeutig, dass *atRA* kein natürlicher Ligand für PPAR β ist.

3.4 Einfluss von Transportproteinen auf die Ligandenaktivierung von PPAR β

Intrazelluläre Transportproteine wie CRABPs („*cellular retinoic acid binding protein*“), CRBPs („*cellular retinol binding protein*“) und FABPs („*fatty acid binding protein*“) binden Fett- bzw. Retinsäuren und deren Derivate und transportieren diese vom Cytoplasma in den Zellkern. Dort dienen diese als Liganden für verschiedene Transkriptionsfaktoren. In den vergangenen Jahren wurde zudem in mehreren Studien gezeigt, dass die verschiedenen Mitglieder der iLBP Familie spezifische Liganden mit einer gewissen Präferenz zu einem bestimmten Transkriptionsfaktor transportieren und dort direkt übergeben („*channeling*“). PPAR β Liganden interagieren demnach spezifisch mit FABP5 (Keratinozyten- oder auch K-FABP). So kommt es nach Bindung eines PPAR β -spezifischen Liganden an FABP5 zur Translokation des Fettsäurebindenden Proteins in den Zellkern und zur direkten Interaktion mit PPAR β . Dies führt zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des Rezeptors (Schug *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2002).

Um die beschriebene Spezifität von FABP5 für den Transport und das „*channeling*“ von PPAR β -spezifischen Liganden und der damit verbundenen verstärkten Transaktivierung des Rezeptors zu untersuchen, wurde die Expression von FABP5 in NIH3T3 Zellen mittels spezifischer siRNA runterreguliert (siehe Kapitel 2.3.2). Anschließend wurden die Zellen für 6 h bzw. 24 h mit verschiedenen Liganden stimuliert und die Auswirkungen des Knockdowns auf die Ligandenaktivierung von PPAR β Zielgenen mittels komparativer qPCR analysiert (siehe Kapitel 2.1.5).

Durch die siRNA-Behandlung wird die Expression von *Fabp5* sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene zu fast 90 % reprimiert (Abb. 3.17. A und B).

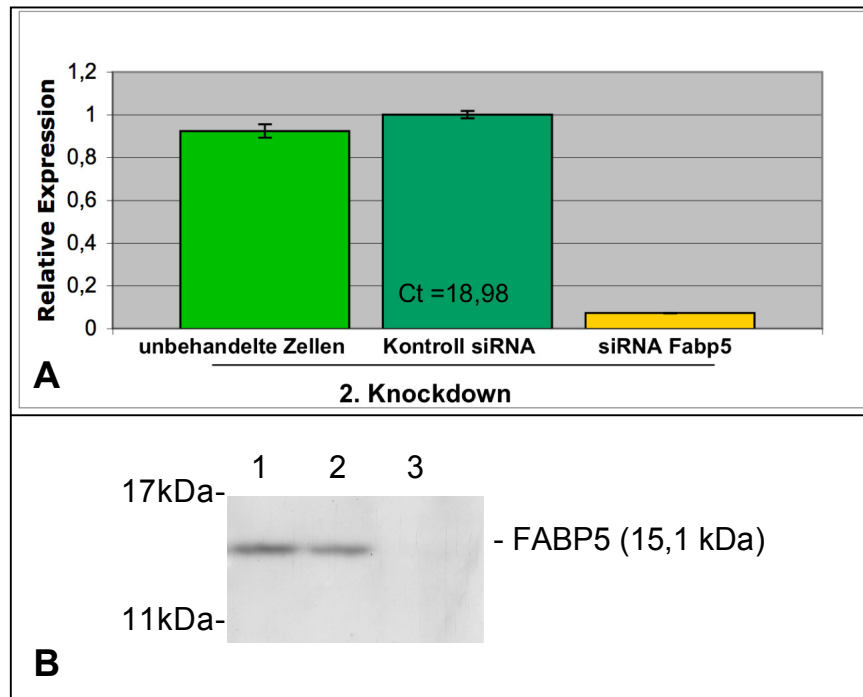


Abb. 3.17: siRNA-vermittelter Genknockdown von *Fabp5* in NIH3T3 Zellen. NIH3T3 Zellen wurden zweimal hintereinander mit spezifischer siRNAs für das Lipid-bindende Protein FABP5 transfiziert. Jeweils 48 h post Transfektion wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Knockdowneffizienz mittels qPCR verifiziert. **A)** Dargestellt sind die relativen Expressionslevel von *Fabp5* 48 h nach der 2. siRNA Behandlung (Kontroll-siRNA = 1). Als zusätzliche Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen. Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. Zusätzlich ist der Durchschnitts-Ct-Wert (aus Triplikaten normalisiert auf *Rpl27* Ct = 18) für die mit Kontroll-siRNA behandelte Probe angegeben. **B)** Verifikation des FABP5 Knockdowns auf Proteinebene. Parallel zur RNA wurde Protein isoliert und der FABP5 Knockdown mittels Western Blot Analyse mit spezifischem FABP5-Antikörper verifiziert. Gleichmäßige Proteinbeladung wurde mittels Ponceau S Färbung der Membran überprüft. Bahn1: unbehandelte Zellen; Bahn 2: Kontroll-siRNA; Bahn 3: siRNA Fabp5.

Die Validierung der direkten PPAR β Zielgene *Adrp* und *Angptl4* zeigt indes nur geringfügige Unterschiede nach 6-stündiger Stimulation mit dem spezifischen Liganden GW501516. Beide Gene zeigen eine leichte Verstärkung in der Aktivierung durch den FABP5 Knockdown (Abb. 3.18.A und B). Am auffälligsten ist der für beide Zielgene zu beobachtende, plötzlich auftretende, reprimierende Effekt auf die Expression nach *atRA* Behandlung, während in den Kontrollansätzen keinerlei Effekte durch *atRA* nachzuweisen sind. Auch auf die Stimulation mit *9cisRA* bzw. die Co-Stimulation mit *9cisRA* und GW hat der Knockdown von *Fabp5* keine deutlichen Auswirkungen. Tendenziell kommt es auch hier eher zu einer geringfügigen Verstärkung der Transaktivierung (B: *Angptl4*) als zu einer Repression.

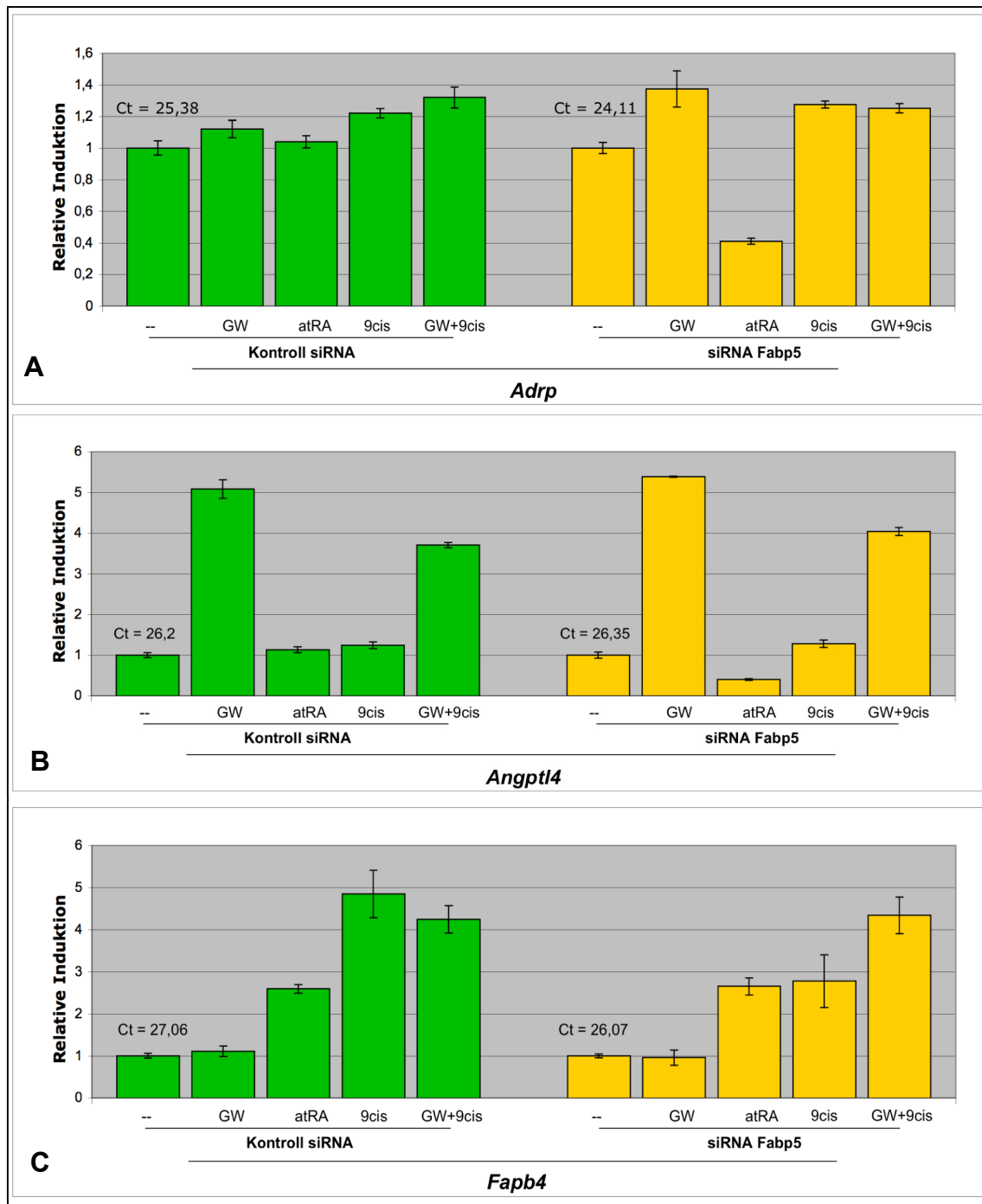


Abb. 3.18: Einfluss des *Fabp5* Knockdowns auf die Aktivierung von *PPAR β* Zielgenen durch verschiedene Liganden. NIH3T3 Zellen wurden zweimal hintereinander mit spezifischen siRNAs für das Lipid-bindende Protein FABP5 transfiziert und anschließend für 6 h bzw. 24 h mit verschiedenen Liganden (0,3 μ M) behandelt (DMSO [--]; GW501516 [GW]; *all-trans* Retinsäure [*atRA*]; *9cis*-Retinsäure [*9cis*]). Anschließend wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels komparativer qPCR analysiert. Dargestellt ist die relative Induktion zur jeweils unbehandelten Probe (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Zusätzlich ist für jede dieser Proben der Durchschnitts-Ct-Wert (aus Triplikaten normalisiert auf *Rpl27* Ct = 18) angegeben. Relative Induktionen für *Adrp* (A) sowie *Angptl4* (B) nach 6-stündiger Stimulation, und *Fabp4* (C) nach 24-stündiger Ligandenbehandlung.

Zu beobachten ist allerdings auch, dass es sowohl für *Adrp* (A) als auch für das indirekte Zielgen *Fabp4* (C) zu einem Anstieg der Expressionsniveaus um jeweils einen

Ct-Wert kommt. Im Gegensatz dazu bleiben die Expressionslevel von *Angptl4* in beiden Zellpopulationen konstant. Diese Effekte scheinen also Gen-spezifisch aufzutreten. Zusätzlich zeigt sich bei *Fabp4* nach 24-stündiger Stimulation mit *9cisRA* eine um fast 50 % geringere Aktivierung im Vergleich zur mit Kontroll-siRNA behandelten Probe, ein Effekt, der mit der ursprünglich prognostizierten Rolle für *Fabp5* nicht zu erklären ist.

Entgegen der Erwartung zeigte der Knockdown von *Fabp5* keine reprimierende Auswirkung auf die Aktivierung von direkten PPAR β Zielgenen nach Stimulation mit dem spezifischen Liganden GW501516.

3.5 Modifikationen an PPAR β

Neben der Modulation der PPAR Aktivität durch die Interaktion mit Agonisten und Antagonisten konnten in verschiedenen Studien für PPAR α und γ auch Auswirkungen von post-translationalen Modifikationen auf die Aktivität der Rezeptoren gezeigt werden. (vgl. Einleitung 1.2.6). Im dritten Teil dieser Arbeit sollte daher PPAR β auf mögliche Modifikationen wie SUMOylierung und Ubiquitinierung untersucht werden.

3.5.1 SUMOylierung

SUMO („*small ubiquitin-related modifier*“) sind kleine ca. 12 kDa große Proteine und gehören in die Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine. SUMOylierung erfolgt, vergleichbar der Ubiquitinierung, durch kovalente Bindung an spezielle Lysinreste (Lysin = K) der entsprechenden Zielproteine. Sie ist dadurch ein Gegenspieler zur Ubiquitinierung. Für PPAR γ wurde die Modifikation durch SUMO an zwei unterschiedlichen Lysinresten beschrieben. Zum einen die SUMOylierung von K77 im murinen PPAR γ 1 (entspricht K107 in PPAR γ 2), zum anderen die Liganden-abhängige SUMOylierung an der zweiten Bindestelle K365 (entspricht K395 in PPAR γ 2).

Ein Proteinsequenzvergleich der verschiedenen PPAR-Subtypen konnte zeigen, dass die zweite SUMO-Bindestelle (K365) hoch konserviert ist zwischen den drei PPAR Rezeptoren (Abb. 3.19).

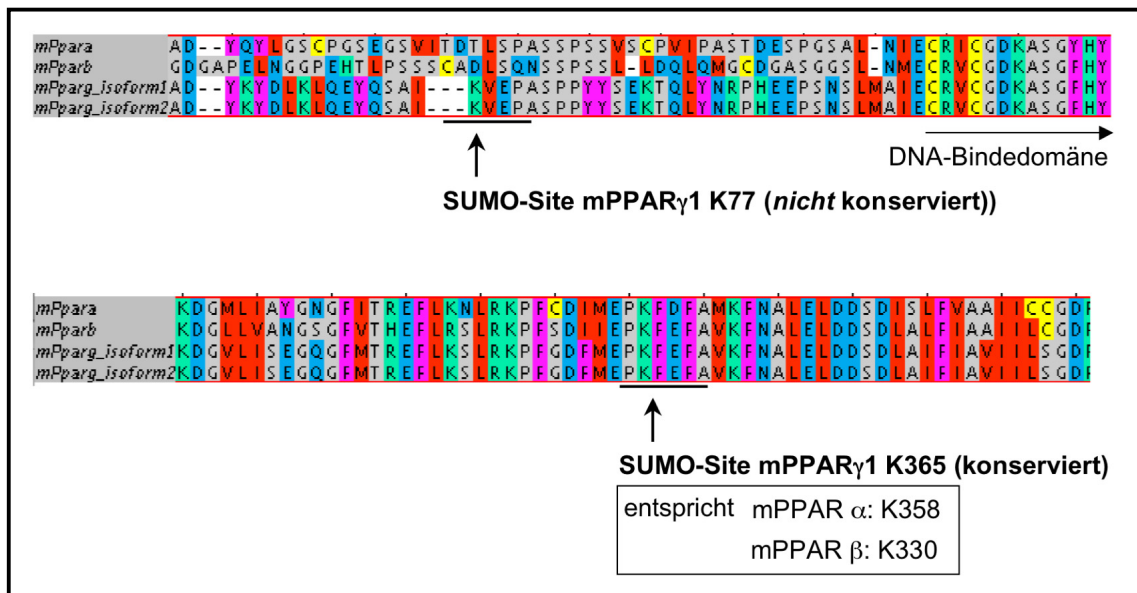


Abb. 3.19: Konservierte und nicht-konservierte PPAR γ SUMOylierungsstellen. Dargestellt sind Ausschnitte aus einem „Proteinalignment“ der verschiedenen murinen PPAR-Subtypen. Hervorgehoben sind die für PPAR γ beschriebenen SUMOylierungsstellen (SUMO-Site): Nicht konservierte SUMO-Site K77 mPPAR γ Isoform1 (= mPPAR γ 2 K107) (obere Reihe). Hoch konservierte Sumo-Site mPPAR γ 1 K365 (= mPPAR γ 2 K395) (untere Reihe). Diese Bindestelle entspricht K330 im mPPAR β und K358 im mPPAR α Subtyp. Folgende Sequenzen wurden für das Alignment verwendet: mPPAR α (ENSMUSP00000059719); mPPAR β (ENSMUSP00000002320); mPPAR γ 1 (EMBL AAC52134); mPPAR γ 2 (ENSMUSP00000000450). Online Tools: MAFFT (Kato *et al.*, 2005) und Jalview (Clamp *et al.*, 2004).

Aufgrund des auch im PPAR β Protein konservierten SUMO-Sequenzmotivs (entspricht K330) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche SUMOylierung des Rezeptors untersucht. So konnten durch *in silico* Analysen weitere mögliche SUMO-Bindestellen im PPAR β Protein vorausgesagt werden. Allerdings konnte weder in radioaktiven *in vitro* Ansätzen noch in Transfektions-basierten Zellkulturexperimenten eine Liganden-unabhängige oder -abhängige, PPAR β -spezifische SUMOylierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bislang gibt es also keine Hinweise für eine Modifikation von PPAR β durch SUMO.

3.5.2 Ubiquitinierung

Ubiquitinierung ist eine weitere Modifikationsmöglichkeit von Proteinen. Dabei führt die kovalente Bindung von Ubiquitin in den meisten Fällen zur Degradation der entsprechenden Proteine über das 26S Proteasom-System. Liganden-abhängige

Ubiquitinierung wurde bereits für PPAR α und PPAR γ beschrieben. Demnach führt die Modifikation durch Ubiquitin bei PPAR α zu einer schnellen Degradation des Rezeptors. Durch Bindung eines spezifischen Liganden kommt es dagegen zur Stabilisierung des Proteins, was sich in einer verminderten Ubiquitinierung und einer verlängerten Halbwertszeit äußert (Blanquart *et al.*, 2002). Bei PPAR γ führt die Ligandenbindung dagegen zu einer verstärkten Modifikation durch Ubiquitin und damit zu einer schnelleren Degradation des Proteins (Hauser *et al.*, 2000).

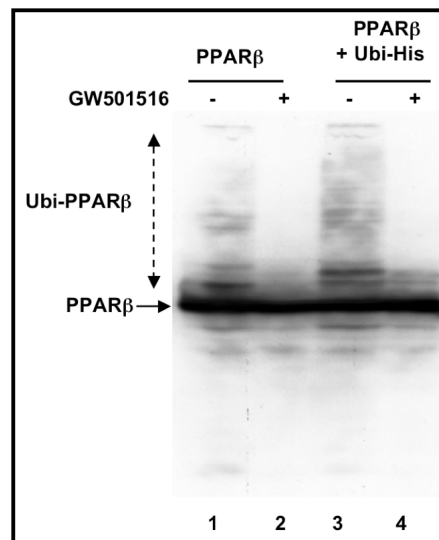


Abb. 3.20: Liganden-abhängige Ubiquitinierung von überexprimiertem PPAR β . HEK293 Zellen wurden mit pCMX-mPparb plus entweder einem Leervektor (Bahnen 1 + 2) oder einem Expressionsvektor für ein Histidin-getaggttes Ubiquitin (Ubi-His; Bahn 3 + 4) transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 1 μ M GW501516 behandelt oder blieben unbehandelt. Die Analyse der Proteinextrakte erfolgte via Western Blot mit PPAR β -spezifischem Antikörper. Dargestellt ist eine Überbelichtung des Blots um die ubiquitinierten, hochmolekularen PPAR β Formen zu zeigen.

Im Rahmen der Untersuchungen zur SUMOylierung von PPAR β in Zellkulturexperimenten konnte nach Überexpression des Rezeptors zusätzliche hochmolekulare Banden des PPAR β Proteins nachgewiesen werden. Wie sich im Laufe weiterer Experimente herausstellte, handelte es sich dabei um ubiquitinierte PPAR β Formen. Ähnlich wie für PPAR α beschrieben, verschwanden diese Banden nach Stimulation der Zellen mit dem spezifischen Liganden GW501516 (Abb. 3.20).

Um daher zu überprüfen, ob die Ligandenbindung von PPAR β Auswirkungen auf dessen Proteinstabilität hat, sollte die Halbwertszeit des Rezeptors in An- und Abwesenheit eines spezifischen Liganden mittels radioaktivem „Pulse-Chase“ Experiment (siehe Kapitel 2.5) überprüft werden.

3.5.3 Einfluss von GW501516 auf die Proteinstabilität von PPAR β

Der Einfluss der Ligandenbindung auf die Proteinstabilität von PPAR β wurde in „Pulse-Chase“ Experimenten mit unterschiedlichen „Chase“-Kinetiken überprüft. Dazu wurde zunächst das murine PPAR β in HEK293 Zellen überexprimiert und ein Teil der Zellen mit dem spezifischen Liganden GW501516 (GW) behandelt. Nach 20 h wurden die Zellen für 45 min in Methionin- und Cystein-freiem Medium gehungert und anschließend für 2 h mit L-[³⁵S]-Methionin und L-[³⁵S]-Cystein metabolisch markiert („Pulse“). Für den „Chase“ erfolgte ein Mediumwechsel auf Standardmedium, anschließend wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Die GW-behandelten Zellen wurden sowohl während des „Pulse“ als auch des „Chase“ fortlaufend mit dem PPAR β Liganden stimuliert. Nach der Zellernte wurde das PPAR β Protein mit einem PPAR β -spezifischen Antikörper immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Phosphoimagers bzw. eines Röntgenfilms visualisiert. Abbildung 3.21.A zeigt ein repräsentatives Experiment mit einem 48-stündigen „Chase“. Wie die quantitative Auswertung des Phosphoimagers zeigt, kommt es durch die GW-Stimulation zu einer Stabilisierung des PPAR β Proteins. Diese äußert sich in einer verlangsamten Degradation (% von t = 0) und daraus resultierend in deutlich höheren Proteinmengen (Signalintensität) bereits zu Beginn, aber auch im weiteren Verlauf des Experiments. Unterschiede in der Proteinstabilität scheinen allerdings vornehmlich zu Beginn des „Chases“ aufzutreten (Abb. 3.21.B und C).

So kommt es in der Anfangsphase (4 - 6 h) in den unbehandelten Proben zu mehr als 50 % Verlust der Proteinmenge, während in den Liganden-behandelten Zellen nur geringfügige Veränderungen nachzuweisen sind. Zu späteren Zeitpunkten des „Chase“ sind grundsätzliche Unterschiede in den Kinetiken kaum noch feststellbar.

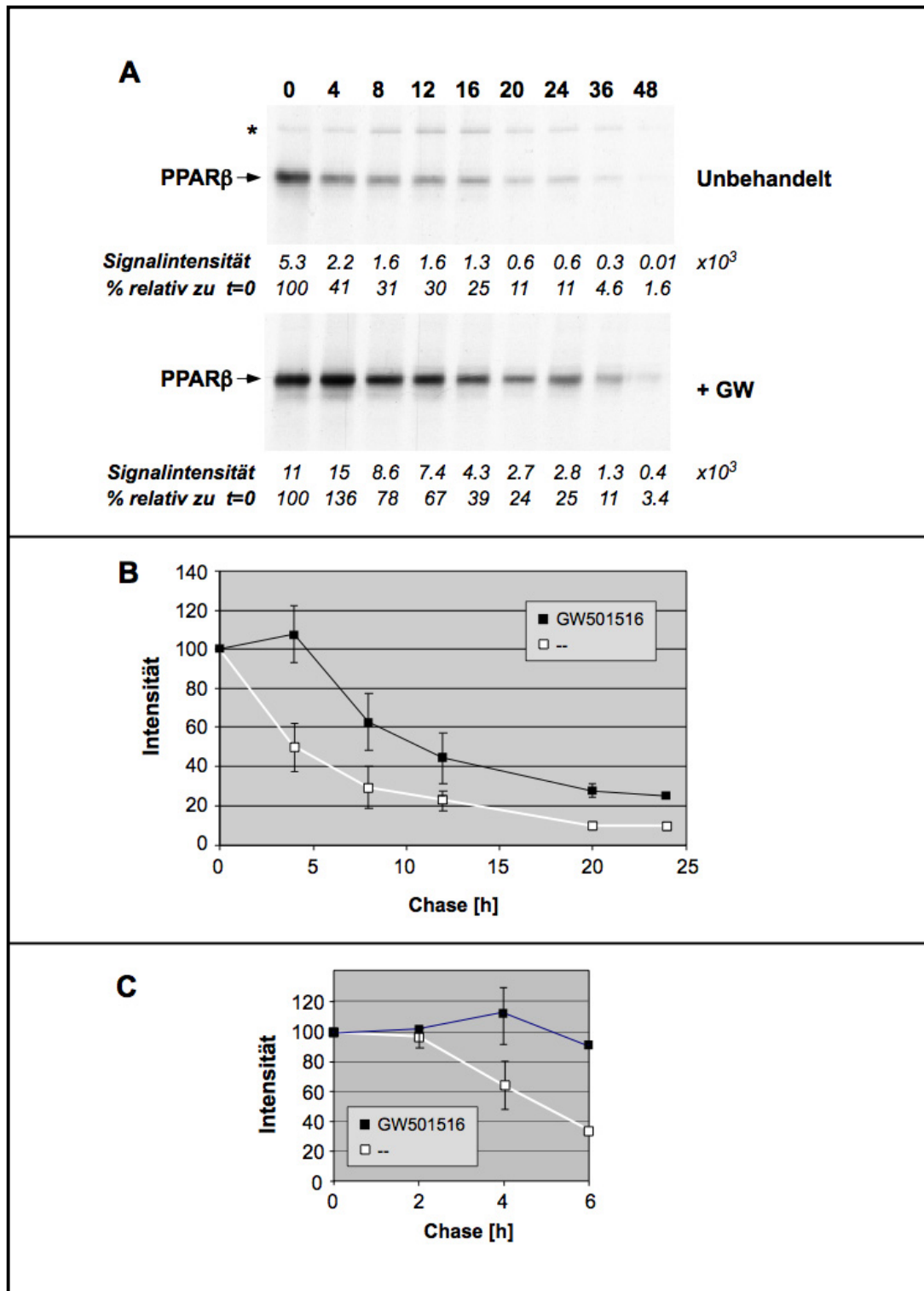


Abb. 3.21: Liganden abhängiger PPAR β -Proteinumsatz nach transienter Überexpression. „Pulse-Chase“ Experimente. Durchführung siehe Text. **A)** Autoradiographie eines 48-stündigen „Chase“ (*unspezifische Bande). Die Signalintensität repräsentiert Phospho-stimulierte Lumineszenz (PSL/mm²/1000). (PSL-Werte generiert durch den Phosphoimager). **B)** Quantitative Auswertung eines 24-stündigen „Pulse-Chase“ Experiments (Phosphoimager). **C)** Quantitative Auswertung eines Kurzzeit (6 h) „Pulse-Chase“ Experiments (Phosphoimager). Signalintensität relativ zum Zeitpunkt 0 h (0 h = 100%). Durchschnittswerte aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Expositionszeiten: 48 h Autoradiographie und 26 h Phosphoimager.

Um zu überprüfen, ob die Proteinmenge an sich Auswirkungen auf die Degradationskinetik, hat wurden die Experimente in den etablierten 3xFlag-Pparb #1 Zellen wiederholt. Diese exprimieren das FLAG-getaggte PPAR β Protein in moderaten Mengen im Vergleich zu einer transienten Überexpression (vgl. Abb. 3.5 Bahn 1 bzw. 4). Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit von ausreichend sensitiven PPAR β Antikörpern zur Detektion geringer bzw. physiologischer Mengen des Rezeptors erfolgte die Immunpräzipitation in diesen Ansätzen über das FLAG-Tag mittels monoklonalem anti-FLAG M2 Antikörper.

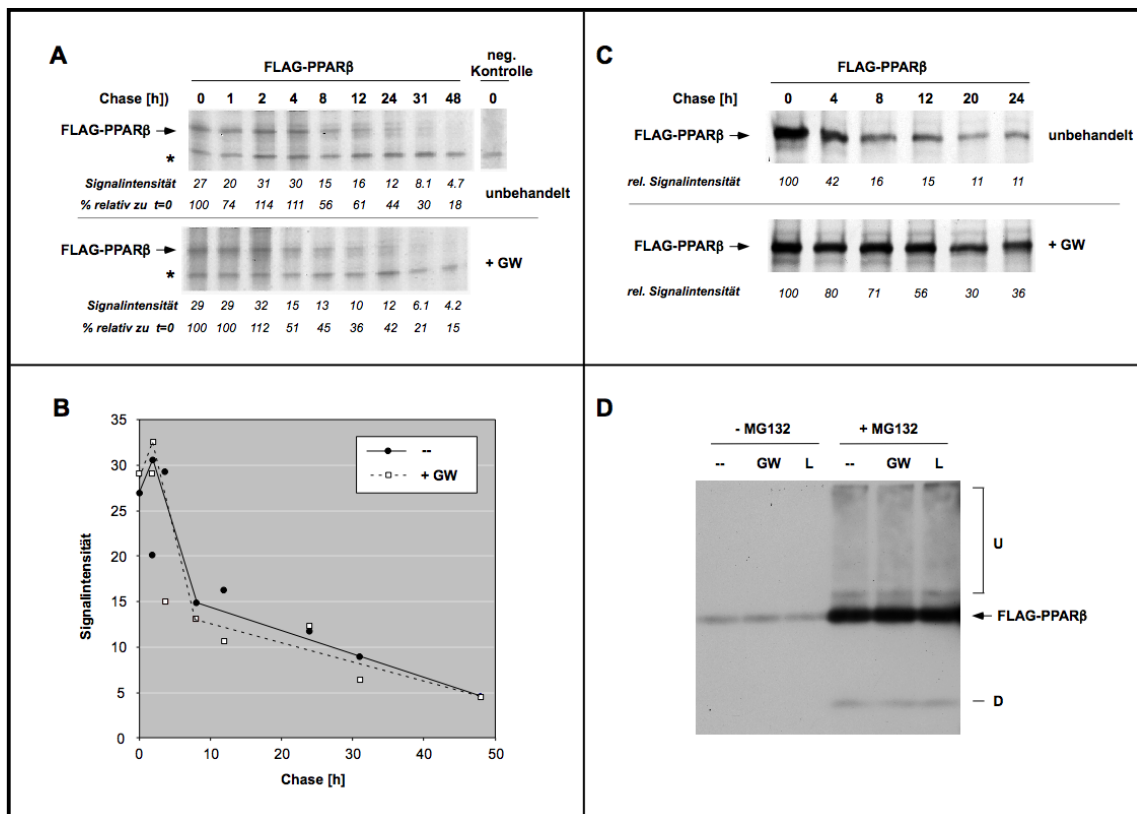


Abb. 3.22: Proteinumsatz von moderat exprimiertem 3xFLAG-PPAR β in retroviral transduzierten Mausfibroblasten. (A) 48-stündiges „Pulse-Chase“ Experiment in 3xFlag-Pparb #1 Zellen. Durchführung wie im Text für Abb. 3.21 beschrieben mit der Ausnahme, dass die Zellen nur 30 min metabolisch markiert wurden („Pulse“). Das Experiment wurde auch mit einem 2-stündigen „Pulse“ wiederholt mit grundlegend identischen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Autoradiographie: Expositionszeit 6 Tage. (*unspezifische Bande) (B) Quantitative Auswertung des Experiments in (A). Phosphoimager: Expositionszeit 24 h. (C) 24-stündiges „Pulse-Chase“ Experiment nach transienter Transfektion von HEK293 Zellen mit pcDNA3.1-zeo-3xFlag-Pparb. Starke Überexpression. Durchführung wie im Text für Abb. 3.21 beschrieben. Signalintensität relativ zum Zeitpunkt 0 h (0 h = 100%). (D) Western Blot Analyse von 3xFlag-Pparb#1 Zellen mit anti-FLAG M2 spezifischen Antikörper. Zellen wurden für 48 h nicht behandelt, mit 1 μ M GW501516 (GW) bzw. mit 2 μ M L165,041 (L) stimuliert oder zusätzlich mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt. Die zusätzliche Behandlung mit MG132 erfolgte erst in den letzten 6 h der Ligandenstimulation. U: vermutlich polyubiquitinierte, hochmolekulare 3xFLAG-PPAR β Formen. D: vermutlich durch MG132 stabilisiertes 3xFLAG-PPAR β Fragment.

Im Vergleich zu den vorherigen Experimenten (Abb. 3.21.A) indiziert die Signalintensität (in PSL/mm²) in diesem Zellsystem eine 100-fach schwächere PPAR β Expression. Unterschiede zwischen unbehandelten und GW-behandelten Proben waren zudem weder zu Beginn noch im Verlauf der Kinetik nachweisbar (Abb. 3.22.A bzw. B). Dabei gleicht die Abbaukinetik des PPAR β Proteins der der GW-behandelten Probe nach transienter Überexpression (vgl. Abb. 3.21.A).

Um auszuschließen, dass der FLAG-Tag für die Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen verantwortlich ist, wurde das FLAG-PPAR β Protein analog dem für das ungetaggte Protein beschriebenen Ansatz transient überexprimiert. Wie in Abbildung 3.22.C zu sehen, verhält sich das FLAG-Protein nach Überexpression sowohl in den unbehandelten als auch in den GW-stimulierten Proben genauso wie das entsprechend ungetaggte PPAR β Protein (vgl. Abb. 3.21.A). Die Überexpression des Rezeptors führt demnach zu einer verstärkten Degradation des Proteins, die durch spezifische Ligandenbindung inhibiert wird. Dagegen zeigt sich nach moderater Expression eine, unabhängig von einer Ligandenbindung, recht hohe Proteinstabilität von mehreren Stunden. Liganden-unabhängige Effekte konnten auch im Western Blot gezeigt werden (Abb. 3.22.D). Dazu wurden 3xFlag-Paprb #1 Zellen mit den spezifischen Liganden GW501516 und L165,041 für 24 h stimuliert. Zudem wurde ein Teil der Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 in den letzten 6 h der Stimulation behandelt. Während GW und L165,041 keine Auswirkungen auf die Proteinmengen haben, kommt es durch den Proteasominhibitor zu einer klaren Stabilisierung des Proteins. Deutlich sichtbar werden auch die bereits in der Überexpression gezeigten (vgl. Abb. 3.20.), vermutlich ubiquitinierten PPAR β Formen [U] sowie ein durch MG132 stabilisiertes Degradationsfragment des Rezeptors [D]. Diese Daten bestätigen, dass PPAR β nach Ubiquitinierung durch das 26S-Proteasomsystem abgebaut wird.

4 Diskussion

Die intensive Forschung rund um die PPARs (Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren) konnte in den vergangenen Jahren zunehmend deren zentrale Rolle bei der Regulation des Energie- und Stoffwechselhaushaltes aber auch bei der Differenzierung von Zellen und Geweben aufzeigen. In diesem Zusammenhang wurden die drei Subtypen der Familie (PPAR α , β und γ) auch als mögliche pharmakologische Angriffspunkte zur Behandlung von weit verbreiteten Erkrankungen wie Adipositas, Typ 2 Diabetes, Dyslipidämien, Arteriosklerose und verschiedenen Tumorerkrankungen identifiziert (siehe Einleitung). Während synthetische PPAR α und PPAR γ Liganden (Fibrate bzw. Thiazolidindione) bereits seit mehreren Jahren erfolgreich zur Behandlung von Dyslipidämie bzw. Typ 2 Diabetes eingesetzt werden, befinden sich erste PPAR β -spezifische Aktivatoren (z. B. GW501516) noch in klinischer Phase II Studien (siehe Einleitung). Aufgrund der zum Teil jedoch widersprüchlichen Befunde, gerade im Hinblick auf die Rolle der PPARs bei der Tumorentstehung und -progression, ist das weitere Verständnis ihrer Wirkmechanismen zur Abschätzung der Sicherheit potentieller pharmakologischer Regulatoren von zentraler Bedeutung. In dieser Hinsicht ist PPAR β der bislang am wenigsten untersuchte Rezeptorsubtyp dieser Familie.

Zur Untersuchung der Rolle von PPAR β bei der Tumorentstehung konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ein syngenes, PPAR β -spezifisches Maustumormodell etabliert werden. Die fehlende Expression des Rezeptors in *Pparb*^{-/-}-Mäusen führte dabei nach anfänglicher Größenzunahme der PPAR β -positiven Tumoren zur Stagnation des Wachstums und schließlich zur vollständigen Remission nach 24 Tagen, während das fortschreitende Tumorwachstum in Wildtyp-Mäusen zum Tod der Versuchstiere führte (siehe Abb. 1.4). Die histologische Charakterisierung von frühen Tumoren aus *Pparb*^{-/-}-Mäusen zeigte einen hyperplastischen Phänotyp der in den Tumor eingewachsenen Endothelzellen (ECs). Hierdurch kommt es zur Ausbildung abnormaler Gefäßstrukturen, gekennzeichnet durch das Fehlen von Lumina und dicken, z. T. „rauen“ Gefäßwänden, verbunden mit einem gestörten Blutfluss. Dieser führt zur Unterversorgung des Tumorgewebes, was die Ursache für die Remissionen der Tumoren darstellt (siehe Abb. 1.5 und 1.6. sowie Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007). Einhergehend mit dem hyperplastischen Phänotyp konnte gezeigt werden, dass die

unreifen *Pparb*-defizienten ECs in den abnormalen Gefäßstrukturen den Proliferationsmarker PCNA deutlich stärker exprimieren als ihre *Pparb* Wildtyp-Pendants, ein weiteres Kennzeichen für die vorliegende Hyperplasie. Neben den LLC-Tumoren konnten diese Beobachtungen zudem auch in einem alternativen *in vivo* Angiogenese-Assay mittels Matrigel-Plugs gezeigt werden (siehe Abb. 1.6). Zusammengenommen deuten all diese Beobachtungen auf eine Funktion des Rezeptors bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen in der Tumorangiogenese hin.

4.1 *In vivo rescue* des hyperplastischen Phänotyps in *Pparb*^{-/-} Endothelzellen

Um zu überprüfen ob die Reexpression von PPAR β ausreichend ist, eine normale Differenzierung der Endothelzellen und damit der Tumorangiogenese in *Pparb*-defizienten Mäusen zu ermöglichen, wurde mittels retroviralem *rescue* der Rezeptor im Matrigel-Plug Assay reexprimiert und die Auswirkungen auf die einwachsenden Gefäße analysiert. Tatsächlich finden sich normale, dünnwandige Gefäße mit Lumen und Erythrozyten nur in solchen Matrigel-Plugs, in denen die Rezeptorexpression in den ECs retroviral rekonstituiert wurde (siehe Abb. 3.1.B links). Im Gegensatz dazu ist die alleinige Anwesenheit von *Pparb* exprimierenden Fibroblasten im Matrigel dafür nicht ausreichend (siehe Abb. 3.1.B rechts). Diese Beobachtungen stimmen mit den initialen Befunden überein, wonach die *Pparb* exprimierenden LLC-Zellen keinen Einfluss auf den Phänotyp der einwachsenden ECs haben. Dieser ist allein abhängig vom genetischen *Pparb* Hintergrund der Versuchstiere und damit von den Zelltypen des umgebenden Tumorstromas und nicht dem der Tumorzellen selbst. Die Hyperproliferation und die fehlende terminale Differenzierung von ECs in *Pparb*^{-/-}-Mäusen wurde bisher nicht während der normalen Angiogenese beobachtet. Sie scheint damit von einer abnormalen Umgebung mit hoher Wachstumsfaktor- und Cytokinkonzentration abhängig zu sein, wie sie speziell in der Nachbarschaft von Tumoren zu finden ist. Diese sezernieren solche Faktoren, um eine das Tumorstromas fördernde Mikroumgebung zu schaffen (Loffek *et al.*, 2006).

Der Einfluss von PPAR β auf die terminale Differenzierung und die Regulation der Proliferation der ECs wird zudem durch mehrere Studien gestützt, die eine solche

Funktion des Rezeptors in unterschiedlichen Zelltypen wie Keratinozyten (Burdick *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Schmuth *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2001), in „Riesenzellen“ des Trophoblasten (Nadra *et al.*, 2006) und in intestinalen Epithelzellen (Marin *et al.*, 2006; Varnat *et al.*, 2006) zeigen konnten. Des Weiteren beschrieben verschiedene Arbeitsgruppen eine nach PPAR β Aktivierung zu beobachtende verminderte Apoptose (Liou *et al.*, 2006) bzw. eine verstärkte Proliferation und Morphogenese von ECs, die mit einer gesteigerten Angiogeneserate korreliert (Gaudel *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008; Piqueras *et al.*, 2007). Insgesamt untermauern diese Befunde eine Rolle von PPAR β bei der (Tumor-) Angiogenese.

4.2 Validierung potentieller PPAR β Zielgene

Zum Verständnis der molekularen Ursachen für die gestörte Tumorangiogenese ist die Identifizierung von PPAR β Zielgenen unter diesen Bedingungen unabdingbar. Daher wurden mit Hilfe von *Microarray*-Studien mit *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Endothelzellen aus dem Matrigel-*Plug Assay* potentielle PPAR β Zielgene identifiziert, die für die Ausbildung des hyperplastischen Phänotyps verantwortlich sein könnten (siehe Kapitel 3.2.1). Insgesamt wurden 66 Gene identifiziert (Schwellenwert: 1,7-facher Expressionsunterschied), die eine differentielle Expression in den *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Endothelzellen zeigten (siehe Supplements Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007) bzw. Tabelle 3.1.). Neben den zu erwartenden Stoffwechsel-regulatorischen Genen waren drei dieser Gene aufgrund ihrer bereits beschriebenen Rolle in der Angiogenese (*Cd36* und *Thbs2*; (Armstrong and Bornstein, 2003) bzw. ihrem direkten Einfluss auf die Zellproliferation (*Cdkn1c*; Lee *et al.*, 1995) von besonderem Interesse.

Weiterhin sollte mit einem alternativen Ansatz durch den Vergleich von Proteinprofilen aus etablierten *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Lungenfibroblastenzelllinien weitere putative Zielgene identifiziert werden. Dazu wurden unterschiedlich fraktionierte Proteinextrakte mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinspots durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte die Identifizierung differentiell exprimierter Proteine massenspektrometrisch durch MALDI-TOF und PMF-Analyse. Auch hier konnten neben Stoffwechsel-relevanten Proteinen weitere neue und im Hinblick auf die Tumorentstehung und Angiogenese interessante potentielle PPAR β Zielgene

identifiziert werden (Adamkiewicz *et al.*, 2007). Zu ihnen zählte neben den beiden Chloridionenkanälen *Clic1* und 4 auch das Retinol-bindende Protein 1 (Rbp1) (siehe Tabelle 1.2).

Zur Validierung der PPAR β -abhängigen Regulation der putativen Zielgene wurde deren Expression in unterschiedlichen PPAR β -abhängigen zellulären Testsystemen mittels qPCR analysiert. Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Zielgene werden in den nachfolgenden Kapiteln einzeln diskutiert.

4.2.1 *Cdkn1c*

Das Gen *Cdkn1c* wurde mittels *Microarray*-Analyse identifiziert und zeigte dort eine 1,7-fach höhere Expression in *Pparb*^{+/+} Endothelien im Vergleich zum Knockout (siehe Tabelle 1.1). *Cdkn1c* codiert für den Zellzyklusinhibitor p57^{KIP2}, der zusammen mit p21^{CIP1} und p27^{KIP1} zur CIP/KIP-Familie der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren gehört (Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995). Diese interagieren vornehmlich mit den Cyclin-CDK Komplexen A/CDK2 und E/CDK2 und inhibieren deren Kinase-Aktivität, was zum G₁ Arrest der Zellen führt (Lee and Yang, 2001).

Die Funktion als direkter Regulator des Zellzyklus macht p57^{KIP2}, gerade auch im Hinblick auf den hyperplastischen Phänotyp und der damit verbundenen Hyperproliferation der *Pparb*-defizienten Endothelzellen, besonders interessant (siehe Abb. 1.5 und 1.6). Die weitere Validierung in den unterschiedlichen zellulären Testsystemen konnte die PPAR β -Abhängigkeit klar bestätigen. So zeigte sich eine 75 % niedrigere Expression im konditionalen Cre-Knockout (siehe Abb. 3.4) und eine deutlich höhere Expression (< 90 %) in beiden 3xFlag-*Pparb rescue* Klonen im Vergleich zur jeweiligen Knockout-Kontrolle (siehe Abb. 3.6 und Tabelle 3.3). Die Stimulation mit dem spezifischen Agonisten GW501516 (GW) zeigte hier jedoch keine weitere Induktion des Gens. Die Tatsache, dass die *Cdkn1c*-Expression im Klon #1 durch GW sogar um fast 45 % abnimmt erklärt sich wahrscheinlich durch die ebenfalls durch die GW-Behandlung um 35 % verminderte *Pparb*-Expression. Dieser Effekt ist bei *Pparb* vermutlich auf eine GW-abhängige Regulation des CMV-Promotors zurückzuführen, unter dessen Kontrolle das Transgen in den *rescue* Klonen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit GW sowohl in NIH3T3 (siehe Abb. 3.3) als auch in HaCaT Zellen (siehe Abb. 3.7) zu einer Stimulation des

physiologischen *Pparb* Promotors und damit zur Induktion der Rezeptor-Expression nach 6 h und 24 h, was auf einen eventuellen positiven Rückkopplungsmechanismus schließen lässt.

Während *Cdkn1c* in den untersuchten murinen Zellen keine positiven GW-Effekte zeigte, konnte in humanen Keratinozyten nach 6 h eine 2-fache GW-abhängige Induktion des Gens beobachtet werden, welche jedoch nach 24 h nicht mehr nachzuweisen war (siehe Abb. 3.7). In weiterführenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten ähnliche Effekte auch in primären humanen Endothelzellen (HuVECs; „*Human umbilical vein endothelial cells*“) gezeigt werden. Durch die *in silico* Analyse des murinen *Cdkn1c* Promotors konnten weiterhin zwei putative PPRE-Elemente (-1670 und -710) identifiziert werden, deren PPAR β -Responsivität durch Reportergerstudien in murinen 2H11 Endothelzellen gezeigt werden konnte (Müller-Brüsselbach *et al.*, 2007). Der Nachweis responsiver PPREs sowie die direkte Aktivierung durch den spezifischen Liganden erfüllen klare Kriterien für ein direktes PPAR β -Zielgen. Allerdings scheint die spezifische Regulation neben dem Zelltyp auch von physiologischen Bedingungen abhängig zu sein.

Der funktionale Zusammenhang zwischen p57^{KIP2}, PPAR β und Zellproliferation konnte in einem Fibroblasten Zellkulturmodell (*rescue* 3xFlag-Pparb #1) aufgezeigt werden. Dabei führte die retrovirale Reexpression von *Pparb* in etablierten *Pparb*^{-/-} Fibroblasten zu einer deutlichen Wachstumsinhibition, die dosisabhängig mit der *Pparb*- und gleichzeitig mit der *Cdkn1c*-Expression korrelierte. Durch die PPAR β -abhängige Wachstumsinhibition in den 3xFlag-Pparb #1 Fibroblasten kam es daher zu einem negativen Selektionsdruck gegen die *Pparb*-Expression. Dies führte mit zunehmenden Passagen zu einer stetigen Abnahme an *Pparb* exprimierenden Zellen und einer entsprechenden Zunahme der Proliferationsgeschwindigkeit (siehe Abb. 3.8 und 3.9). Die Behandlung der Zellen mit einer gegen *Cdkn1c* gerichteten siRNA konnte diesem negativen Selektionsdruck entgegenwirken, was sich in einer signifikant verminderten Abnahme der *Pparb*-Expression äußerte (siehe Abb. 3.10).

Zusammengefasst unterstützen diese Befunde ein Modell, in dem die verminderte Expression von *Cdkn1c* zur Hyperproliferation der *Pparb*-defizienten Tumor- und ins Matrigel einwachsenden Endothelzellen beiträgt. Übereinstimmend mit einem solchen Modell zeigen *Cdkn1c* Knockout-Mäuse eine gestörte terminale Differenzierung und Hyperplasien in unterschiedlichen Geweben (Zhang *et al.*, 1997).

Mit Hilfe der *Microarray*-Analysen konnten jedoch weitere regulierte Gene in den Matrigel Endothelzellen identifiziert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass der komplexe hyperplastische Phänotyp nicht allein durch die verminderte Expression von *Cdkn1c* hervorgerufen wird.

4.2.2 *Cd36* und *Thbs2*

Zwei weitere Gene für die bereits eine Rolle in der Angiogenese beschrieben wurde sind der Fettsäuretransporter und Thrombospondinrezeptor CD36 sowie sein Ligand Thrombospondin 2 (THBS2 oder auch TSP2) (Armstrong and Bornstein, 2003). Beide Gene zeigten, wie *Cdkn1c*, eine ebenfalls höhere Expression in *Pparb* Wildtyp-ECs (*Cd36* 1,9-fach und *Thbs2* 1,7-fach siehe Tabelle 3.1). Weiterhin konnte die für *Thbs2* beobachtete Regulation im *Microarray* auch nach transientem siRNA Knockdown in NIH3T3 Zellen und im konditionalen Flox-Cre Knockout gezeigt werden (siehe Abb. 3.3 und 3.4). Übereinstimmend damit führte die Reexpression von *Pparb* in den *rescue* Klonen zu einer, im Gegensatz zum Knockout deutlich nachweisbaren, *Thbs2*-Expression (siehe Abb. 3.6). Geringe GW-Effekte (+ 28 %) waren dagegen nur nach 6-stündiger Stimulation in den mit Kontroll-siRNA behandelten NIH3T3 Zellen nachweisbar (siehe Abb. 3.3).

Das aus Homotrimeren bestehende Thrombospondin 2 ist ein matrizelluläres Protein (eine Untergruppe der extrazellulären Proteine) (Bornstein and Sage, 2002) und gehört zur Familie der Thrombospondine (Hiscott *et al.*, 2006). *Thbs2* wird u. a. von Gefäßen umgebenden Fibroblasten sezerniert und wirkt in parakriner, aber auch in autokriner Form auf Endothelzellen. Dort hemmt es die Angiogenese durch Inhibition der durch Mitogene (wie bFGF, IGF und VEGF) stimulierten Zellproliferation und durch Induktion von Apoptose. Dabei führt es ähnlich wie *Cdkn1c* zu einem G₀/G₁ Arrest der Zellen (Armstrong *et al.*, 2002; Bornstein *et al.*, 2000). Zudem beeinflusst THBS2 die Migration von Endothelzellen (Armstrong and Bornstein, 2003). Seine Wirkung vermittelt THBS2 durch Bindung an seinen Rezeptor CD36. *Cd36* wurde schon mehrfach als Zielgen der PPARs beschrieben (Sato *et al.*, 2002; Tontonoz *et al.*, 1998; Westergaard *et al.*, 2001) und zeigte im *Microarray* ebenfalls eine verminderte Expression in den Knockout-ECs. Dem entsprechend kommt es im pLPCX Knockout-Klon ebenfalls zu einer um 55 % niedrigeren *Cd36*-Expression im Vergleich zum

3xFlag-Pparb #1, zusätzlich ließ sich diese durch GW nach 48-stündiger Inkubation nochmals um das 50-fache steigern (siehe Abb. 3.6). CD36 ist neben THBS2 auch der Rezeptor für THBS1, für das in zahlreichen Studien ebenfalls seine antiangiogene Wirkung gezeigt werden konnte (Armstrong and Bornstein, 2003; Iruela-Arispe *et al.*, 1999; Volpert, 2000). Die verminderte Expression von *Cd36* sowie dessen Ligand Thrombospondin 2 lässt vermuten, dass ein für die Angiogenese wichtiger regulatorischer Signalweg in den *Pparb*-defizienten Endothelzellen gestört ist. Gerade die fehlende Inhibition der Proliferation der ECs könnte dabei im Zusammenwirken mit der verstärkten Proliferation, hervorgerufen durch die verminderte *Cdkn1c*-Expression, zum hyperproliferativen Phänotyp der ECs beitragen (siehe Abb. 4.1). Zudem könnte die Ausbildung abnormaler Gefäßstrukturen auf eine gestörte Migration der ECs zurückzuführen sein.

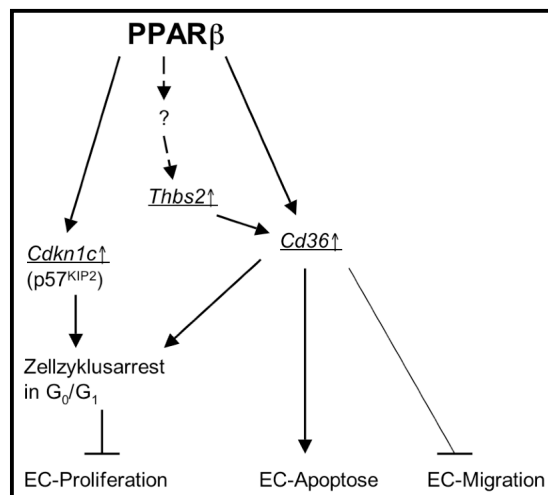


Abb. 4.1: PPARβ-abhängige Regulation von *Cdkn1c*, *Thbs2* und *Cd36* und deren Einfluss auf das Wachstum und die Migration von Endothelzellen (ECs). Details siehe Text.

4.2.3 Igfbp3

Das „insulin-like growth factor“-bindende Protein 3 (*Igfbp3*) ist ein weiteres, mittels *Microarray*-Analyse identifiziertes potentiellles Zielgen. Auch dieses Gen zeigte eine verminderte Expression in den Knockout-ECs. IGFBP3 gehört zu einer Proteinfamilie mit 6 Mitgliedern (IGFBP1-6). 90 % des IGFBP3 Proteins findet man in zirkulierenden heterotrimeren Komplexen mit ALS („acid labile subunit“) sowie IGF-I und -II („insulin-like growth factor“) im Serum (Firth and Baxter, 2002). Neben dieser

endokrinen Transportfunktion spielt IGFBP3 in der Zelle auch in autokriner und parakriner Form eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferation und Apoptose, über IGF-abhängige und -unabhängige Signalwege (siehe Abb. 4.2). Zudem führt die Induktion von *Igfbp3* in zahlreichen Tumorzelllinien und *in vivo* Tumoren zu verringertem Tumorwachstum und verstärkter Apoptose (reviewed in Jerome *et al.*, 2003). Weiterhin konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass IGFBP3 proangiogene Wirkungen hat, indem es die Migration, Differenzierung und Gefäßbildung von endothelialen Vorläuferzellen fördert (Chang *et al.*, 2007).

Die Validierung der *Igfbp3*-Expression in den verschiedenen Testsystemen kam jedoch zu keinem einheitlichen Ergebnis. Während sich die Expression in den Cre-Knockoutzellen wie auch im *Microarray* reduzierte (- 68 %), zeigte der pLPCX #L2 Knockout eine 3 bis 30-fach höhere Expression im Vergleich zu den beiden *rescue* Klonen #1 und #3 (siehe Tabelle 3.3). Weiterhin führte die Stimulation mit GW zu einer Repression in den 3xFlag Klonen und zu einer Induktion im Knockout, so dass diese Regulationen wohl auf PPAR β -unspezifische Effekte dieser Substanz zurückzuführen sind. Eine Studie von Degenhard und Kollegen konnte zudem zwar die humanen Gene für *IGFBP1*, 2, 5, und 6 als primäre PPAR Zielgene identifizieren, nicht jedoch die für *IGFBP3* und 4 (Degenhardt *et al.*, 2006). Zwar erfolgte die Studie in humanen Zellkulturen, aufgrund der nicht zu beobachtenden Ligandenaktivierung in den hier verwendeten murinen Testsystemen ist eine direkte Aktivierung als primäres PPAR β Zielgen aber auch hier fraglich. Da IGFBP3 jedoch durch eine Vielzahl von Stimuli und Faktoren induziert wird (siehe Abb. 4.2), können sekundäre PPAR β -abhängige Effekte nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise wurde erst kürzlich TGF β -1 als direktes PPAR β Zielgen in VSMC („vascular smooth muscle cells“) beschrieben (Kim *et al.*, 2008), während verschiedene Studien eine direkte Induktion von *Igfbp3* durch TGF β schon früher zeigen konnten (Hwa *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 1995; Rajah *et al.*, 1997). Ein Zusammenhang über TGF β wäre somit u. a. denkbar.

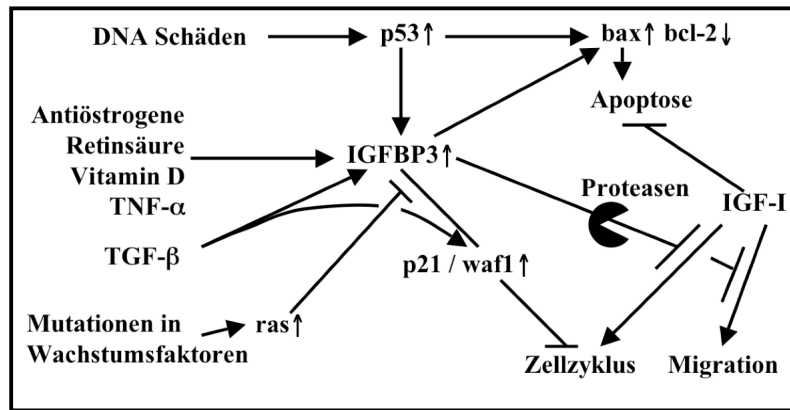


Abb. 4.2: IGFBP3-abhängige, antiproliferative Regulationsmechanismen. Verschiedene Agenzien (z. B. Retinsäure, Vitamin D), Cytokine (z. B. TNF α , TGF β) und zelluläre Effektoren (z. B. p53) induzieren die *Igfbp3*-Expression. IGFBP3 induziert Apoptose über mitochondriale Signalwege (bax) auch in Abwesenheit von p53. Die Inhibition der DNA Synthese erfolgt vermutlich durch Induktion von p21/waf und kann durch den ras-abhängigen MAP-Kinase Signalweg inhibiert werden. Zudem inhibiert IGFBP3 die durch IGF-vermittelte Stimulation des Zellzyklus, die Inhibition der Apoptose sowie die Migration von Zellen durch die Bindung („sequestration“) von IGF. Dieses kann partiell durch proteolytische Degradation von IGFBP3 durch Proteasen wieder freigesetzt werden. (Abbildung verändert nach Firth and Baxter, 2002)

4.2.4 *Clic1* und *Clic4*

Die Chloridionenkanäle CLIC1 und 4 wurden durch Vergleich von Proteinprofilen von *Pparb*^{+/+} und ^{-/-} Lungenfibroblasten als potentielle Zielgene identifiziert. Dort zeigten beide eine verminderte Expression in den *Pparb*-defizienten Zellen (siehe Tabelle 3.2). Beide gehören zur Proteinfamilie der intrazellulären Chloridionenkanäle (CLICs), die sieben Mitglieder umfasst (Suh and Yuspa, 2005). CLIC1 und 4 sind an zahlreichen, unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt und werden u. a. mit Zellproliferation, Apoptose und der Tumorentwicklung in Verbindung gebracht (Bohman *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Fernandez-Salas *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Ronnov-Jessen *et al.*, 2002; Shiio *et al.*, 2006; Suh *et al.*, 2004; Suh and Yuspa, 2005; Sun *et al.*, 2006).

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass die CLIC4-Expression direkt durch p53, Myc und TGF β reguliert wird (Fernandez-Salas *et al.*, 2002; Ronnov-Jessen *et al.*, 2002; Shiio *et al.*, 2006), was CLIC4 eng mit der Tumorentwicklung assoziiert (Suh *et al.*, 2005). Weiterhin steigt die Expression des Gens während der Differenzierung von Keratinozyten an und sowohl die Überexpression als auch der siRNA-vermittelte Knockdown des Proteins führen zur Apoptose (Fernandez-Salas *et al.*, 1999; Fernandez-Salas *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 2007b). Des Weiteren wurde für CLIC4 eine Rolle bei der Regulation der Proliferation und

Differenzierung von Endothelzellen und der Tumorangiogenese beschrieben. Das Protein scheint dabei an der Gefäßbildung beteiligt zu sein (Bohman *et al.*, 2005).

Die Validierung der *Clic4*-Expression in aus dem Matrigel-*Plug Assay* stammenden Proben konnte die verminderte Expression in den *Pparb*^{-/-} ECs ebenfalls bestätigen (Adamkiewicz *et al.*, 2007), wohingegen die Ergebnisse aus den anderen Testsystemen teilweise kontrovers sind. So konnten z. B. im Flox-Cre System keine signifikanten Unterschiede in der Expression festgestellt werden. Dagegen zeigte sich nach spezifischem *Pparb* Knockdown ein geteiltes Bild. Während es in den Kontroll-siRNA behandelten Wildtyp-Zellen zu einer leichten GW Induktion (24 h, 1,6-fach) kam, war die Expression im Knockdown nach 6 h zunächst erhöht (1,4-fach bzw. 1,8-fach + GW) und fiel nach 24 h auf ca. 80 % der Wildtyp-Expression ab (bzw. 13 % + GW). Ähnlich kontrovers ist die Situation auch in den *rescue*-Ansätzen (siehe Tabelle 3.3). Die verstärkte Expression des Gens nach *Pparb*-Knockdown bzw. -Knockout ist auch für die etablierten PPAR β Zielgene *Angptl4* und *Adrp* zu beobachten und erklärt sich wahrscheinlich aus der Aufhebung der PPAR β vermittelten Gen-Repression in Abwesenheit von Liganden (Krogdams *et al.*, 2002; Oishi *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2002). Interessanterweise scheint diese Regulation nur Gen- und Zelltyp-spezifisch aufzutreten. Zudem kommt es in Folge der zunächst verstärkten Induktion anscheinend zu kompensatorischen Ereignissen, so dass die Aktivierung im weiteren zeitlichen Verlauf abnimmt (siehe Tabelle 3.3 *Adrp*, *Angptl4* und *Clic4* in *Pparb* siRNA Proben: 6 h und 24 h). Dies könnte auch die fehlende Regulation von *Clic4* im Flox-Cre System nach 48 h erklären. Ein weiterer kausaler Zusammenhang zwischen PPAR β und CLIC4 ergibt sich aus der Tatsache, dass beide Proteine an der Regulation der Keratinozytendifferenzierung beteiligt sind (Burdick *et al.*, 2006; Fernandez-Salas *et al.*, 1999; Fernandez-Salas *et al.*, 2002; Michalik and Wahli, 2007; Schmutz *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2007a; Suh *et al.*, 2007b; Westergaard *et al.*, 2001). Dazu passend steigt die Expression von *CLIC4* in HaCaT Zellen durch GW501516 nach 24 h, wenn auch nur geringfügig, um das 1,3-fache an (siehe Tabelle 3.3). Insgesamt sprechen die Beobachtungen für eine PPAR β -abhängige Regulation von *Clic4*, auch wenn, ähnlich der Ergebnisse für *Igfbp3*, aus diesen Daten keine abschließende Aussage über eine direkte oder indirekte Regulation getroffen werden kann. In Bezug auf den hyperplastischen Phänotyp könnte die verminderte *Clic4*-Expression in den *Pparb*^{-/-}

ECs, ähnlich wie von Bohman und Kollegen beschrieben, zu einer verminderten Differenzierung und gestörten Gefäßbildung beitragen (Bohman *et al.*, 2005).

Für *Clic1* ist die *Pparb*-Abhängigkeit dagegen eher fraglich, da weder im siRNA Knockdown noch im konditionalen Cre-Knockout *Pparb*-abhängige Effekte gezeigt werden konnten. Zudem waren auch in den entsprechenden Wildtyp-Proben keine positiven GW-Effekte nachweisbar. Lediglich in pLPCX #L2 Zellen zeigte sich nach 48 h eine um ca. 30 % verminderte Expression (siehe Tabelle 3.3). Die geringe GW-Induktion (1,4-fach) in humanen HaCaT Zellen nach 24 h spricht eher für einen sekundären Mechanismus und scheint Spezies-bedingt zu sein.

4.2.5 *Rbp1*

Das Retinol-bindende Protein RET1 oder auch CRBP1 (Gen: *Rbp1*) ist an der Regulation des Vitamin A Metabolismus beteiligt. Dort dient es als „Carrier“ beim intrazellulären Transport von Retinoiden (Molotkov *et al.*, 2004), welche u. a. als Ligand für die Kernrezeptoren RAR und RXR fungieren. Zudem konnte in zahlreichen humanen Tumoren eine verminderte Expression von CRBP1 nachgewiesen werden (Bistulfi *et al.*, 2006; Cvetkovic *et al.*, 2003; Esteller, 2003; Jeronimo *et al.*, 2004; Kwong *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2004)

CRBP1 zeigte beim Vergleich von Proteinprofilen in *Pparb*-defizienten Lungenfibroblastenlinien eine höhere Expression im Vergleich zum Wildtyp (siehe Tabelle 3.2). Diese Daten konnten auch auf transkriptioneller Ebene in den entsprechenden Lungenfibroblastenlinien, aber auch in den aus dem Matrigel-*Plug Assay* stammenden Proben gezeigt werden (Adamkiewicz *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine im *Pparb*-Knockout bzw. -Knockdown eine vornehmlich reduzierte *Rbp1*-Expression. Lediglich in den mit *Pparb* siRNA behandelten Proben kam es nach 6 h zunächst zu einem leichten Anstieg von 20 %, der nach 24 h allerdings auf 64 % der Kontroll-siRNA behandelten Wildtyp-Expression abfiel (siehe Tabelle 3.3). Geringe positive GW-Effekte (+ 20 %) waren ebenfalls nach 6-stündiger GW-Behandlung in der Kontroll-siRNA behandelten Wildtyp-Probe nachweisbar, nicht jedoch nach 24 h. Dagegen zeigten HaCaT Zellen eine 2,4-fache GW-Induktion nach 24 h.

Crbp1 wurde bereits als PPAR β Zielgen in Leber-Stellarzellen beschrieben. Hellmans und Kollegen konnten zwei nicht konservierte PPAR β responsive PPREs im murinen Promotor identifizieren, zudem identifizierten sie ein ebenfalls nicht konserviertes PPRE im humanen Promotor. Interessanterweise konnten sie in *in vitro* Gelshift-Experimenten (EMSA) auch zeigen, dass ein konserviertes RARE-Promotorelement ebenfalls in der Lage war, ein Konsensus PPRE spezifisch zu kompetieren und PPAR β :RXR α Heterodimere zu binden (Hellemans *et al.*, 2003). Die Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Testsystemen könnten sich durch Zelltyp-bedingte Unterschiede erklären. PPAR β reguliert die Transkription über verschiedene Mechanismen. Dazu gehört die DNA-abhängige Interaktion mit verschiedenen Co-Aktivatoren und Co-Repressoren sowie mit dem Retinoid X Rezeptor RXR (Degenhardt *et al.*, 2006; Feige *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005). Zusätzlich kommt es unabhängig von einer DNA-Bindung zu einer Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor BCL6 (Lee *et al.*, 2003). Das genaue Zusammenspiel dieser komplexen Regulationsmechanismen ist bisher wenig verstanden. Es ist aber wahrscheinlich, dass letzten Endes die Verfügbarkeit und die Konzentration der verschiedenen beteiligten Transkriptions- und Co-Faktoren sowie deren Stöchiometrie über die Regulation potentieller Zielgene mit entscheiden. Die direkte Bindung von PPAR β :RXR Heterodimeren an ein RARE und dem dadurch zu erwartenden „Crosstalk“ mit dem RAR-Signalweg wäre ein weiterer potentieller Mechanismus, über den PPAR β mögliche Zielgene regulieren könnte. Allerdings bleibt abzuwarten, inwieweit eine solche Regulation auch *in vivo* gezeigt werden kann.

4.2.6 Weitere PPAR β regulierte Zielgene: *Angptl4*, *PPAR γ* , *Fabp4*

Angptl4 („angiopoietin-like protein 4), auch *Fiaf* („fasting induced adipose factor“) genannt, wird ebenfalls mit der Angiogenese assoziiert, allerdings wird auch seine Rolle noch kontrovers diskutiert (Hato *et al.*, 2008). Während drei Studien einen positiven Einfluss auf das Endothelzellüberleben bzw. die Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen und damit auf die Angiogenese beschreiben (Hermann *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2000; Le Jan *et al.*, 2003), zeigen verschiedene andere Studien einen negativen Einfluss durch Inhibition der EC-Proliferation und -Migration sowie der

Neovaskularisierung (Cazes *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008). Zudem scheint *Angptl4* an der Metastasierung von Tumoren beteiligt zu sein (Galaup *et al.*, 2006; Padua *et al.*, 2008). *Angptl4* wurde in unterschiedlichen Zelltypen als primäres Zielgen für alle drei PPAR Subtypen identifiziert, dabei stand seine stoffwechselphysiologische Rolle als Inhibitor der Lipoproteinlipase (LPL) jedoch im Vordergrund (Kersten *et al.*, 2000; Schmuth *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2000). Ein funktionelles PPRE konnte im Intron 3 des murinen und humanen *ANGPTL4* Gens nachgewiesen werden (Mandard *et al.*, 2004) und entsprechend zeigte sich eine Regulation auch in allen hier untersuchten Testsystemen mit teils deutlichen GW-Induktionen bereits nach 6 h (siehe Tabelle 3.3). Überraschenderweise steigt die Expression des Gens auch nach Knockdown und Knockout von PPAR β (siehe Abb. 3.3 und 3.6), eine Beobachtung, die auch schon *in vivo* in PPAR β Knockout-Mäusen unter Fütterung einer fettreichen Diät gemacht werden konnte (Akiyama *et al.*, 2004). Die molekularen Abläufe für diese Art der Regulation sind noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung wäre die Aufhebung der PPAR β vermittelten Rekrutierung von Co-Repressoren (Krogsgaard *et al.*, 2002; Oishi *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2002) durch die fehlende PPAR β -Expression (siehe Abb. 1.3 und 4.4).

Bei der Validierung der *Pparg*-Expression in den unterschiedlichen Testsystemen fiel auf, dass die Expression von *Pparg* sowohl im Flox-Cre als auch im pLPCX # L2 Knockout um 50 % bzw. 75 % abnahm. Auf der anderen Seite führte die Stimulation von PPAR β sowohl in Kontroll-siRNA behandelten NIH3T3 Zellen als auch in HaCaT Zellen zu einer verstärkten *Pparb*-Expression, die ebenfalls mit einer gesteigerten *Pparg*-Expression korrelierte. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung des 3xFlag-Pparb #1 mit GW eine um 35 % verminderte *Pparb*-Expression. Diese erklärt sich wahrscheinlich durch eine dosisabhängige negative Rückkopplung auf den viralen CMV-Promotor, unter dessen Kontrolle das Transgen exprimiert wird. Interessanterweise korreliert aber auch hier die *Pparg*-Expression mit der verminderten *Pparb*-Expression. Die Beobachtungen suggerieren eine positive Regulation der *Pparg*-Expression durch *Pparb*. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit Untersuchungen in Präadipozyten, wonach PPAR β Gene induziert, die für die weitere Differenzierung (*Ppar γ 2*) und die Lipideinlagerung (*Cd36*, *Fabp4*) benötigt werden

(Bastie *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001; Matsusue *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu kamen Studien von Zou *et al.* zu dem Ergebnis, dass *Pparb* die *Pparg*-Expression reprimiert (Zuo *et al.*, 2006). Die PPAR β -vermittelte Induktion von *Pparg* würde zudem auch die GW-abhängige Induktion von *Fabp4* erklären, wobei auch hier direkte Effekte nicht ausgeschlossen werden können.

Da auch PPAR γ bzw. dessen Aktivatoren als Regulatoren der Angiogenese beschrieben wurden (zusammengefasst in Giaginis *et al.*, 2008), könnte eine PPAR β -abhängige Regulation der PPAR γ -Expression ebenfalls Einfluss auf die Angiogenese nehmen.

Die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen festgestellte, teilweise zelltyp-spezifische, PPAR β -abhängige Regulation der RXR-Subtypen (siehe Tabelle 3.3) eröffnet eine weitere Möglichkeit zum „Crosstalk“ mit anderen regulatorischen Signalwegen (Woods *et al.*, 2007). Bildet RXR doch mit zahlreichen anderen Kernrezeptoren, wie z. B. dem Thyroid Hormon Rezeptor (TR), Retinsäure Rezeptor (RAR), Vitamin D Rezeptor (VDR), Leber X Rezeptor (LXR), Farnesoid X Rezeptor (FXR) aber auch den konstitutiv aktiven CAR-Rezeptoren regulatorische Komplexe (Mangelsdorf and Evans, 1995). Dies führt zu einer weiteren Erhöhung der Komplexität der durch PPAR β beeinflussten Signalwege.

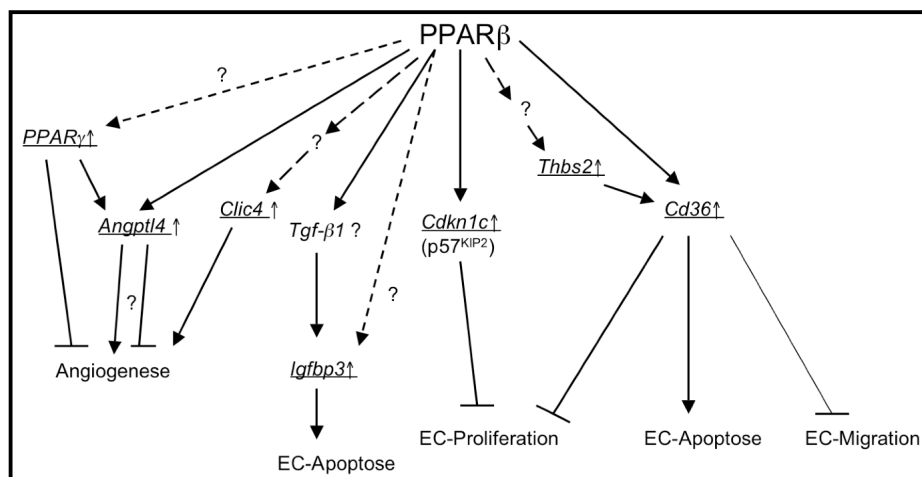


Abb. 4.3: Einfluss von PPAR β Zielgenen auf Wachstum und Differenzierung von Endothelzellen. Schematisches Modell. PPAR β reguliert eine Vielzahl von Genen, die eine Rolle bei der Proliferation und Migration von Endothelzellen (ECs) spielen. Damit fungiert PPAR β als wichtiger Regulator der Angiogenese. Details siehe Text.

Durch die Suche nach PPAR β Zielgenen mittels *Microarray*-Analysen und *Proteomics* konnte eine Vielzahl an Genen identifiziert werden, die teilweise auch eine direkte oder

indirekte Rolle in der Angiogenese spielen. Die PPAR β -Abhängigkeit konnte für einen Teil dieser Gene in unterschiedlichen Testsystemen gezeigt werden. Wie PPAR β die Expression dieser Gene genau reguliert und wie diese bei der Regulation der Angiogenese zusammenspielen, ist zumeist jedoch noch unklar und bedarf entsprechend weiterführender Untersuchungen (siehe Abb. 4.3).

4.2.7 *all-trans* Retinsäure ist kein natürlicher Ligand von PPAR β *in vitro* und *in vivo*

Der Vitamin A Metabolit *all-trans* Retinsäure (*atRA*) wurde als potentieller natürlicher Ligand für PPAR β beschrieben (Shaw *et al.*, 2003). *atRA* galt bis dahin vornehmlich als Ligand für die Retinsäurerezeptoren (RAR α ; β ; γ), die als Heterodimere mit RXR analog den PPAR:RXR-Komplexen an entsprechende RARE-Elemente binden und so die Transkription ihrer Zielgene regulieren (Aranda and Pascual, 2001; Kastner *et al.*, 1997). Die Aktivierung der RA-Rezeptoren führt dabei meist zu Zelldifferenzierung (Park *et al.*, 1999; Rochette-Egly and Chambon, 2001), Zellzyklusarrest (Donato *et al.*, 2007) und Apoptose (Altucci *et al.*, 2001; Donato and Noy, 2005; Kitareewan *et al.*, 2002). Schug und Kollegen beschrieben kürzlich, dass *atRA* sowohl RAR als auch PPAR β aktivieren kann, was im letzteren Fall zur Induktion von Überlebenssignalwegen und damit zur Proliferation der Zellen führt (Schug *et al.*, 2007). Entscheidend dafür welcher Kernrezeptor in der Zelle durch *atRA* aktiviert wird, ist nach dieser Studie das Verhältnis von FABP5 zu CRABP2, zwei kleinen Fettsäurebindenden Proteinen, die zur Familie der intrazellulären Lipid-bindenden Proteine (iLBPs) gehören (Gutierrez-Gonzalez *et al.*, 2002; Kleywegt *et al.*, 1994; Veerkamp and Maatman, 1995). iLBPs binden entsprechend Retinsäuren oder Fettsäuren und transportieren diese vom Cytoplasma in den Kern, wo sie diese direkt an ihren spezifischen Kernrezeptor übergeben („*channeling*“) (Budhu and Noy, 2002; Dong *et al.*, 1999; Manor *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2002; Yasmin *et al.*, 2004). Ist das Verhältnis von CRABP2 zu FABP5 hoch (CRABP2 > FABP5), kommt es demnach zur Aktivierung der RAR Rezeptoren, was folglich zu Zellzyklusarrest und Apoptose führt. Wird jedoch FABP5 stärker exprimiert als CRABP2 (FABP5 > CRABP2), gelangt *atRA* über FABP5 zu PPAR β und es kommt zur Induktion von zellulären Überlebenssignalwegen wie dem PI3K/AKT Signalweg und zu einer verstärkten

Zellproliferation (Schug *et al.*, 2007). *atRA* käme damit in Abhängigkeit von CRABP2 und FABP5 eine wichtige Rolle in der Regulation zwischen Apoptose und Proliferation in der Zelle zu.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation konnten die von Shaw *et al.* und Schug *et al.* prognostizierte Rolle für *atRA* als spezifischer PPAR β Ligand in keiner Weise bestätigen. So führte die *atRA* Stimulation weder in einem auf LexA- bzw. Gal4-PPAR β -LBD Fusionsprotein beruhenden Reportersystem noch in einem über ein PPRE reguliertes Reportersystem zu einer PPAR β -vermittelten, signifikanten Aktivierung. Dagegen zeigte der spezifische Agonist GW501516 eine deutliche, PPAR β -abhängige Induktion des Reportergens in allen drei Systemen (siehe Abb. 3.11; 3.13; 3.14). Wie bereits beschrieben (Issemann *et al.*, 1993), erfolgt die stärkste Transaktivierung des PPRE-Reporterkonstruktes (siehe Abb. 3.14) nach Co-Transfektion und Co-Stimulation von RXR α und PPAR β (5-fach). Die durch *9cisRA* zu beobachtende 2,6-fache Induktion nach Transfektion von RXR α erklärt sich vermutlich durch die Bildung von RXR Homodimeren. Diese sind nach *9cisRA* Aktivierung *in vitro* (Zhang *et al.*, 1992) und *in vivo* (Ijpenberg *et al.*, 2004)) in der Lage an PPRE-Elemente (DR-1) zu binden. Keinerlei Effekte konnten jedoch nach *atRA* Stimulation nachgewiesen werden.

Die weitere *in vivo* Analyse in HaCaT Zellen, im etablierten *rescue* Zellsystem (pLPCX #L2 vs. 3xFlag-Pparb #3) und in Pparb siRNA behandelten Zellen konnte zwar die Ergebnisse der Reportergenstudien klar bestätigen, jedoch war auch hier keinerlei PPAR β -vermittelte Aktivierung durch *atRA* nachweisbar (siehe Abb. 3.15 und 3.16). Für alle drei Zellsysteme konnte das für die *atRA*-Regulation vorausgesetzte Verhältnis von FABP5 zu CRABP2 (FABP5 > CRABP2) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.12; 3.15 und nicht gezeigte Daten). Eine Induktion der primären PPAR β Zielgene *Adrp* und *Angptl4* erfolgte jedoch nur nach GW501516 (GW) Stimulation bzw. noch deutlicher nach Co-Stimulation mit GW und dem RXR Liganden *9cisRA*.

Die deutlichsten Ergebnisunterschiede zwischen den Studien zeigten sich vor allem in HaCaT Zellen. So konnten Schug und Kollegen in diesem Zelltyp bereits mit 0,1 μ M *atRA* für die PPAR β Zielgene *ADRP* und *ANGPTL4* eine wenigstens 2-fache Induktion beobachten. Zudem wurden in dieser Studie beide Gene durch *9cisRA* maximal 1,5-fach induziert. Zwar konnten auch in den hier gezeigten Experimenten mit zunächst

0,5 μM *atRA* eine Induktion der beiden PPAR β Zielgene (2,5-fach bzw. 3,2-fach) beobachtet werden, nach einer Reduzierung der *atRA* Konzentration auf 0,3 μM waren diese Effekte jedoch nicht mehr nachweisbar. Dagegen wurden die Gene sowohl durch 0,5 μM als auch durch 0,3 μM des RXR Liganden *9cisRA* ca. 3- bis 5-fach induziert (siehe Abb. 3.15). Eine Erklärung für die zunächst sichtbaren *atRA* Effekte liegt demnach in der produktionsbedingten Kontamination von *atRA* mit dem *9cis*-Isomer (Altucci and Gronemeyer, 2001). Die Funktionalität der eingesetzten *atRA* Konzentration konnte zudem eindeutig durch die Induktion des etablierten *atRA* Zielgens *CYP26A1* (Loudig *et al.*, 2000) und in einem kommerziellen, RAR-spezifischen *in vitro* TR-FRET Ligandenbindungsassay gezeigt werden (siehe Abb. 3.15 sowie nicht gezeigte Daten von Dr. Wolfgang Meißner). Die Diskrepanzen zwischen der von Schug *et al.*, 2007 beschriebenen Rolle für *atRA* als PPAR β -spezifischer Ligand und den hier dargestellten Untersuchungen lassen sich schwerlich erklären, da vergleichbare experimentelle Ansätze *in vitro* und *in vivo* die publizierten Ergebnisse nicht reproduzieren konnten. Unterstützt werden diese Befunde zudem durch weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die ebenfalls zeigen konnten, dass *atRA* in einem PPAR β -spezifischen kommerziellen *in vitro* TR-FRET Ligandenbindungsassay und Kompetitionsassay nicht an PPAR β bindet (nicht gezeigte Daten von Dr. Wolfgang Meißner; Rieck *et al.*, 2008; zur Publikation eingereicht). Die Ergebnisse von Schug und Kollegen stehen zudem im Widerspruch zu verschiedenen früheren Studien die zeigen konnten, dass die Proliferation von HaCaT Zellen PPAR β -abhängig inhibiert wird (Burdick *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Man *et al.*, 2008; Martinasso *et al.*, 2006; Schmuth *et al.*, 2004; Westergaard *et al.*, 2001).

Zusammen zeigen diese Experimente eindeutig, dass *atRA* kein Ligand für PPAR β ist und dass die Ergebnisse, die in diesem Zusammenhang bisher veröffentlicht wurden, (Schug *et al.*, 2007; Schug *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2003) kritisch zu hinterfragen sind.

4.3 Einfluss von Transportproteinen auf die Liganden-abhängige Aktivierung von PPAR β Zielgenen

FABP5 ist als Transporter für PPAR β Liganden beschrieben. Demnach führt die Bindung von spezifischen Liganden an FABP5 zur Translokation des Proteins in den Zellkern und zur direkten Interaktion mit PPAR β , was zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des Rezeptors beiträgt (Schug *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2002). Der Zusammenhang zwischen FABP5 und Liganden-abhängiger PPAR β Aktivierung wurde mittels spezifischem *Fabp5* siRNA Knockdown in NIH3T3 Zellen untersucht. Durch die siRNA Behandlung konnte die *Fabp5*-Expression sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene um ca. 90 % reduziert werden (siehe Abb. 3.17). Entsprechend den Literaturdaten wäre zu erwarten gewesen, dass es durch den Knockdown zu einer verringerten Transaktivierung von PPAR β Zielgenen nach Stimulation mit dem synthetischen Liganden GW501516 kommt. Stattdessen zeigten *Adrp* und *Angptl4* eine leicht verstärkte Aktivierung durch den Knockdown (siehe Abb. 3.18). Die Repression der beiden Gene, wie sie nach *Fabp5* Knockdown und gleichzeitiger *atRA* Behandlung zu beobachten war, ist unerwartet und lässt sich bisher nicht erklären. Ein PPAR β -abhängiger Weg, wie er nach der Studie von Schug und Kollegen theoretisch denkbar gewesen wäre, (durch die fehlende Verfügbarkeit von *atRA* als Ligand für PPAR β und der dadurch hervorgerufenen Repression), kommt aus zwei Gründen nicht in Betracht: Erstens führt der *Fabp5* Knockdown nicht grundsätzlich zu einer Repression der beiden PPAR β Zielgene, was jedoch gerade im unstimulierten Zustand zu erwarten gewesen wäre, da das „channeling“ durch FABP5 insbesondere für die niedrig konzentrierten endogenen Liganden wichtig sein soll (Schug *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2002). Zweitens ist *atRA*, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, nicht in der Lage, direkt an PPAR β zu binden und vermag entsprechend spezifische Zielgene nicht zu aktivieren (siehe Kapitel 4.2.7). Diese Tatsache konnte zudem auch nochmal in den Kontroll-siRNA behandelten Zellen gezeigt werden (siehe Abb. 3.18).

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse aus dieser Untersuchung nicht die in der Literatur beschriebenen Effekte (Schug *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2002). Ursache dafür könnten neben Zelltyp- und Liganden-spezifischen Effekten vor allem auch Kompensationsmechanismen zwischen den zum Teil redundanten FABPs sein (Wolfrum, 2007).

4.4 Posttranslationale Modifikation von PPAR β

4.4.1 SUMOylierung

Die transkriptionelle Aktivität der PPARs wird neben der Interaktion mit Liganden und Co-Faktoren auch durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Für PPAR γ wurde die Modifikation durch SUMO („*small ubiquitin-related modifier*“) bereits beschrieben (Ohshima *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2005). Ein Protein-Sequenzvergleich der beiden SUMOylierungsstellen zeigte die Homologie der murinen PPAR γ 1 K365 Bindestelle zwischen den drei PPAR Subtypen (entspricht K358 im mPPAR α und K330 im mPPAR β Protein, siehe Abb. 3.19). Weder *in vitro* noch *in vivo* Untersuchungen konnten jedoch eine direkte SUMOylierung des PPAR β Rezeptors nachweisen. Interessanterweise konnte in weiterführenden Experimenten mittels Immunpräzipitation nach Überexpression von FLAG-getaggttem SUMO dennoch gezeigt werden, dass PPAR β in Komplexen mit anderen Faktoren interagiert, die ihrerseits wieder SUMOyliert werden. Wie die Co-Präzipitationsstudien weiterhin zeigen konnten, war diese Interaktion GW-abhängig und verminderte sich deutlich in Anwesenheit des Liganden (unveröffentlichte Daten Diplomarbeit Lena Wedeken, 2006).

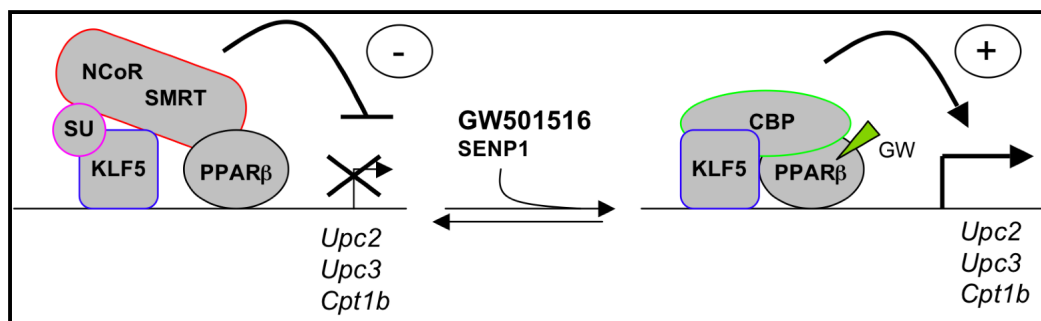


Abb. 4.4: Modell der Transkriptionsregulation von *Ucp2*, *Ucp3* und *Cpt1b* durch PPAR β /KLF5 Komplexe im Skelettmuskel. Unter basalen unstimulierten Bedingungen interagiert SUMOyliertes (SU) KLF5 mit PPAR β und Co-Repressoren (SMRT, NCoR). Nach PPAR β -spezifischer Ligandenbindung kommt es zur DeSUMOylierung von KLF5 durch die Protease SENP1 und zur Rekrutierung von Co-Aktivatoren (z. B. CBP), was zur Transaktivierung der entsprechenden Gene führt. (Abbildung verändert nach Oishi *et al.*, 2008).

Eine Erklärung für diese Beobachtungen liefert eine aktuelle Studie von Oishi und Kollegen die zeigen konnten, dass PPAR β unter basalen Bedingungen mit dem SUMOylierten Transkriptionsfaktor KLF5 („*krüppel-like transcription factor 5*“) und Co-Repressoren interagiert und so die Transkription von direkten Zielgenen wie *Cpt1b*, *Ucp2* und *Ucp3* reprimiert. Durch PPAR β -spezifische Ligandenbindung kommt es

dagegen zur DeSUMOylierung von KLF5 und damit zur Rekrutierung von Co-Aktivatoren und zur Expression der entsprechenden Zielgene (siehe Abb. 4.4) (Oishi *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der Studie von Oishi und Kollegen unterstützen damit die Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe. Da die SUMOylierung von Proteinen jedoch häufig von weiteren Modifikationen, wie z. B. einer Phosphorylierung, abhängig zu sein scheint (Hietakangas *et al.*, 2003), kann sie anhand der durchgeführten Experimente für PPAR β nicht endgültig ausgeschlossen werden.

4.4.2 Ubiquitinierung

Wie im Rahmen der Untersuchungen zur SUMOylierung nach Überexpression von PPAR β festgestellt werden konnte, wird auch dieser Rezeptorsubtyp ähnlich wie PPAR α und γ durch Ubiquitin modifiziert (Blanquart *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 2000). So konnte in Abhängigkeit von spezifischen Liganden eine Abnahme von höher molekularen, ubiquitinierten PPAR β -Formen gezeigt werden (siehe Abb. 3.20). Vergleichbare Effekte wurden auch schon für PPAR α beschrieben (Blanquart *et al.*, 2002). Die weitere Charakterisierung der PPAR β -spezifischen Ubiquitinierung nach Überexpression in Zellkultursystemen konnte zudem zeigen, dass diese von RXR α und dessen Liganden 9cisRA unabhängig ist (Daten nicht gezeigt). Die Suche nach den entsprechenden Ubiquitinbindestellen im PPAR β Protein konnte auch durch den Einsatz zahlreicher Deletions- und Lysinmutanten, insbesondere im Bereich der für die Ligandenbindung verantwortlichen AF-2 (Helix 12) in der Ligandenbindungsdomäne (vgl. Abb. 1.2), nicht gelöst werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Untersuchung der Quervernetzung zwischen den einzelnen Lysinresten durch den Einsatz entsprechender Ubiquitinmutanten brachte keine endgültigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Es scheint allerdings unter den Bedingungen der Überexpression zu einer Polyubiquitinierung an unterschiedlichen Lysinresten des PPAR β Rezeptors mit verschiedenen Ubiquitin-Quervernetzungen („Multiubiquitinierung“) zu kommen.

Um die Auswirkungen der Liganden-abhängigen Ubiquitinierung auf die Proteinstabilität des Rezeptors zu untersuchen, wurden Halbwertszeitstudien mit metabolisch radioaktiv markiertem Rezeptor in verschiedenen Kinetiken durchgeführt („Pulse-Chase“ Experimente). Wie die Auswertung der verschiedenen Experimente

zeigt, kommt es insbesondere nach massiver Überexpression des Rezeptors in Anwesenheit eines spezifischen Liganden zur Stabilisierung des Rezeptors (siehe Abb. 3.21). Im Gegensatz dazu konnte unter den Bedingungen einer moderaten Expression keine Unterschiede in den Degradationskinetiken in Abhängigkeit eines Liganden gezeigt werden (siehe Abb. 3.22 A und B).

Die Unterschiede zwischen den Degradationskinetiken erklären sich damit allein aus den verschiedenen Expressionsniveaus des PPAR β Rezeptors. Unterstützt wird diese Annahme durch weiterführende Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die Behandlung von 3xFlag-Pparb #1 Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132, unabhängig von einer Ligandenstimulation, zu einer deutlichen Stabilisierung des Rezeptors führt (siehe Abb. 3.22.D). Unter diesen Bedingungen waren auch die in der transienten Überexpression beobachteten höher molekularen, vermutlich ubiquitinierten PPAR β -Formen sowie ein durch MG132 stabilisiertes Degradationsprodukt nachweisbar. Insgesamt belegen diese Daten, dass PPAR β nach Ubiquitinierung durch das 26S-Proteasomsystem abgebaut wird. Zudem zeigt der Rezeptor auch in Abwesenheit eines externen Liganden eine recht hohe Proteinstabilität von mehreren Stunden, auf die eine spezifische Ligandenbindung keinen weiteren Einfluss nimmt. Es kann mit diesen Ansätzen jedoch nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass endogene Liganden, wie ungesättigte Fettsäuren, unter physiologischen Bedingungen permanent an den Rezeptor binden und so zu dessen hoher Stabilität beitragen.

Eine schnelle proteosomale Degradation des PPAR β Rezeptors und stabilisierende Effekte nach Ligandenbindung konnten kürzlich auch in einer ähnlichen Studie gezeigt werden (Genini and Catapano, 2007). Allerdings erfolgte auch hier der Großteil der durchgeführten Experimente nach massiver Überexpression des Rezeptors. Ebenso wurden die entsprechenden Studien für PPAR α und PPAR γ vornehmlich nach Überexpression der Rezeptoren durchgeführt (Blanquart *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der hier dargestellten Untersuchungen im Hinblick auf die Auswirkungen der Überexpression auf die Proteinstabilität mahnen jedoch zur Vorsicht bei der Interpretation der entsprechenden Daten.

4.4.3 Auswirkungen der Überexpression von PPAR β

Weiterführende Studien unserer Arbeitsgruppe konnten eine mögliche Ursache für die schnelle Degradation des Rezeptors nach massiver Überexpression aufklären. In Abhängigkeit von der Proteinmenge kommt es zur Ausbildung von hochmolekularen PPAR β -Proteinkomplexen mit einem Molekulargewicht bis zu mehreren MDa. Diese bestehen vornehmlich aus PPAR β Oligomeren und lassen sich durch spezifische Ligandenbindung partiell wieder auflösen (Wedeken, 2006). Die Ausbildung dieser Komplexe nach Überexpression von PPAR β führt demnach zu einer verstärkten Ubiquitinierung und damit zu deren Degradation. Durch die Ligandenbehandlung lösen sich diese Komplexe dagegen partiell wieder auf, was zu einer verminderten Ubiquitinierung führt und so zur höheren Stabilität beiträgt. Das Vorkommen solcher abnormalen Komplexe unter physiologischen Bedingungen ist fraglich, allerdings wurden große Komplexe aus PPAR-Homodimeren nach Überexpression bereits in einer früheren Studien beschrieben (Feige *et al.*, 2005). Neben der Möglichkeit eines PPAR β Reservoirs könnten diese Komplexe aber auch als Sicherheitsmechanismus der Zelle unter pathophysiologischen Bedingungen dienen, um eine Deregulation von Zielgenen infolge einer Überexpression zu verhindern.

Der Nachweis hochmolekularer, abnormaler PPAR β -Proteinkomplexe liefert zwar eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten in der Degradation des PPAR β Proteins nach massiver, transienter und moderater Expression (vgl. 3.5.3). Gleichzeitig verdeutlichen diese Ergebnisse aber auch die Problematik von Experimenten nach transienter Überexpression als Standardprozedur in der zellbiologischen Forschung. Besonders die im Hinblick der so für PPAR β als auch für PPAR α und γ erhaltenen Literaturdaten sind aufgrund dieser Ergebnisse kritisch zu hinterfragen.

4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die PPAR β -Abhängigkeit für einen Teil der mittels *Microarray*-Analyse bzw. *Proteomics* identifizierten Zielgene bestätigt werden. In den meisten Fällen war der Nachweis als direktes Zielgen jedoch nicht möglich. Die *in silico* Identifizierung von PPRE-Elementen, der Nachweis ihrer Responsivität und der direkte *in vivo* Nachweis einer PPAR β -spezifischen Bindung durch Chromatin-

Immunpräzipitation (ChIP) sind mögliche Ansatzpunkte zur weiteren Charakterisierung dieser Zielgene. PPAR β reguliert seine Zielgene zudem über verschiedene direkte und indirekte Wege im komplexen Zusammenspiel mit weiteren Co-Faktoren und durch „*Crosstalk*“ mit anderen Transkriptionsfaktoren und Signalwegen. Die hier beobachtete Regulation der RXR Subtypen eröffnet eine weitere Dimension dieses regulatorischen Netzwerkes. Neben der Identifizierung von Zielgenen und deren Einordnung in regulatorische Netzwerke ist es jedoch auch wichtig das molekulare Zusammenspiel von PPAR β und seinen Interaktionspartnern auf Proteinebene besser zu verstehen, zeigen doch die verschiedenen teilweise auch etablierten Zielgene wie *Adrp*, *Angptl4*, *Cpt1a* und *Pdk4* mitunter deutliche Unterschiede in Bezug auf Stärke und Kinetik ihrer Aktivierung in den unterschiedlichen Testsystemen.

Weiterhin ungelöst bleibt die Frage nach dem endogenen, PPAR β spezifischen Liganden. Die Charakterisierung von Stoffwechselprodukten aus dem Fettsäuremetabolismus in PPAR β -spezifischen *in vitro* und *in vivo* Ligandenbindungsassay könnte hier weiteren Aufschluss geben.

Das weitere Verständnis dieser komplexen, zum Teil Zelltyp-spezifischen Regulationen, sind eine wichtige Grundvoraussetzung und eine große Herausforderung im Hinblick auf die möglichen Potentiale des Rezeptors als pharmakologischer Angriffspunkt zur Behandlung von Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes mellitus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und möglicherweise auch Krebs. Die Frage nach der Sicherheit solcher Medikamente wird eine der zentralen Fragestellungen in diesem Zusammenhang sein. Die sich zunehmend abzeichnende Rolle von PPAR β als wichtiger Regulator der Zelldifferenzierung konnte auch durch diese Arbeit für Endothelzellen und der damit verbundenen Angiogenese weiter untermauert werden. Bislang ist die Rolle von PPAR β in Bezug auf die Tumorentstehung jedoch noch kontrovers. Der Rezeptor scheint unterschiedliche Funktionen im Tumor und im umgebenden Tumorstromagewebe zu haben und so bedarf es weiterer intensiver Forschung, um diese zu entschlüsseln und um zu klären, ob sich diese Eigenschaften positiv oder negativ auf seine mögliche pharmakologische Nutzung auswirken.

5 Zusammenfassung

Der Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptor β (PPAR β) ist ein Liganden-induzierter Transkriptionsfaktor. PPAR β spielt eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus und bei der Energiehomöostase, weiterhin übernimmt er eine regulatorische Funktion bei der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose. Zudem zeigten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe eine Funktion in der Tumorangio-genese. Demnach führt die genetische Inaktivierung des Rezeptors zu einem hyperplastischen Phänotyp der in den Tumor einwachsenden Endothelzellen (ECs). Die Folge ist ein Vaskularisierungsdefekt, der für die Inhibition des Wachstums von syngen *Lewis Lung* Tumoren in der Maus verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die retrovirale Reexpression von PPAR β zu einer verstärkten Reifung und Differenzierung von Endothelzellen in einem *in vivo* Modellsystem (Matrigel) führt. Im gleichen Modell waren bereits potentielle Zielgene von PPAR β identifiziert worden, die im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen experimentellen Systemen in Zellkultur validiert und charakterisiert wurden (genetische Inaktivierung, Reexpression und RNAi-vermittelte Inhibition von *Pparb*). Dabei konnte neben den Genen der bekannten Angiogenese-Regulatoren *Cd36* und *Thbs2* auch das für den Zellzyklusinhibitor p57^{KIP2} codierende *Cdkn1c* Gen als positiv reguliertes PPAR β Zielgen nachgewiesen werden. Zudem konnte ein funktionaler Zusammenhang zwischen PPAR β und p57^{KIP2} bei der Regulation der Proliferation von Fibroblasten gezeigt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss von Liganden und Transportproteinen auf die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors analysiert werden. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde *all-trans* Retinsäure (*atRA*) als PPAR β Ligand beschrieben und sollte, im Gegensatz zu seiner bekannten Funktion als Ligand für die Retinsäure-Rezeptoren, über eine Bindung an PPAR β die Zellproliferation stimulieren. Untersuchungen der vorliegenden Dissertation konnten eine transkriptionelle Aktivierung von PPAR β und seiner Zielgene durch *atRA* sowie einen Einfluss des Fettsäuretransporters FABP5 jedoch eindeutig widerlegen.

Die Fragestellung des dritten Teils dieser Arbeit war die nach einer möglichen posttranslationalen Modifikation von PPAR β durch Ubiquitinierung oder SUMOylierung, wie sie teilweise auch schon für PPAR α und PPAR γ beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar keine SUMOylierung von PPAR β nachgewiesen werden, jedoch eine deutliche Modifikation durch Ubiquitin und Degradation über das 26S-Proteasomsystem. Ein stabilisierender Einfluss von Liganden auf die Halbwertszeit von PPAR β wurde spezifisch nach dessen Überexpression beobachtet und könnte somit unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen relevant sein.

6 Summary

Peroxisome proliferator-activated receptor β (PPAR β) is a ligand-induced transcription factor. PPAR β plays essential roles in lipid metabolism and energy homeostasis and has important functions in the regulation of cell proliferation, differentiation and apoptosis. Additionally, previous work of our group unravelled an unexpected role in tumour angiogenesis. The genetic disruption of the *Pparb* gene leads to tumour endothelial hyperplasia and deregulation of tumour angiogenesis. As a consequence syngeneic lewis lung tumour growth is impaired in *Pparb*-deficient mice.

In the present thesis it could be shown that the retroviral transduction of PPAR β triggers microvessel differentiation and maturation in an *in vivo* model system (matrigel). Several potential PPAR β target genes were previously identified in the same model. As part of the present work, the PPAR β responsiveness of these target genes was validated and characterised in various cell culture systems (genetic disruption, reexpression and RNAi knockdown of *Pparb*). In addition to the known regulators of angiogenesis *Cd36* and *Thbs2*, we identified the *Cdkn1c* gene encoding the cell cycle inhibitor p57^{KIP2} as a PPAR β target gene. Furthermore, a functional connection between PPAR β and p57^{KIP2} in the regulation of fibroblast proliferation could be demonstrated.

In the second part of this work, the influence of ligands and intracellular fatty acid transport proteins on the transcriptional activity of the PPAR β receptor has been analysed. *All trans*-retinoic acid (*atRA*) has recently been reported to act as a ligand for PPAR β , to activate its transcriptional activity and, in contrast to the “classical” function of *atRA*, to stimulate cell proliferation. In contrast to these findings, results of the present work rule out a direct activation of PPAR β and its target genes by *atRA*. Additionally, no influence of the fatty acid binding protein 5 (FABP5) on transcriptional activity of PPAR β could be detected.

The third part of this work addressed the question as to whether PPAR β is post-translational modified by ubiquitin or SUMO, as previously reported for PPAR α and / or PPAR γ . In the present thesis, SUMOylation of PPAR β was undetectable, whereas modification by ubiquitination and degradation by the 26S-proteasome system could be clearly demonstrated. Additionally, a stabilising influence of ligand-binding was seen

only under conditions of PPAR β overexpression, which might serve as a safeguard mechanism protecting the cell from deregulated PPAR β expression under certain pathophysiological conditions.

7 Literaturverzeichnis

- Abbot, E.L., McCormack, J.G., Reynet, C., Hassall, D.G., Buchan, K.W. and Yeaman, S.J. (2005) Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells. *Febs J*, **272**, 3004-3014.
- Adamkiewicz, J., Kaddatz, K., Rieck, M., Wilke, B., Müller-Brüsselbach, S. and Müller, R. (2007) Proteomic profile of mouse fibroblasts with a targeted disruption of the peroxisome proliferator activated receptor-beta/delta gene. *Proteomics*, **7**, 1208-1216.
- Adams, M., Montague, C.T., Prins, J.B., Holder, J.C., Smith, S.A., Sanders, L., Digby, J.E., Sewter, C.P., Lazar, M.A., Chatterjee, V.K. and O'Rahilly, S. (1997) Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest*, **100**, 3149-3153.
- Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., Kogel, U., Scheffner, M., Helin, K. and Eilers, M. (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell*, **123**, 409-421.
- Adida, A. and Spener, F. (2006) Adipocyte-type fatty acid-binding protein as inter-compartmental shuttle for peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists in cultured cell. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 172-181.
- Akiyama, T.E., Lambert, G., Nicol, C.J., Matsusue, K., Peters, J.M., Brewer, H.B., Jr. and Gonzalez, F.J. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J Biol Chem*, **279**, 20874-20881.
- Altucci, L. and Gronemeyer, H. (2001) The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 181-193.
- Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C. and Gronemeyer, H. (2001) Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med*, **7**, 680-686.
- Amri, E.Z., Bonino, F., Ailhaud, G., Abumrad, N.A. and Grimaldi, P.A. (1995) Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem*, **270**, 2367-2371.
- Aoyama, T., Peters, J.M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T. and Gonzalez, F.J. (1998) Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem*, **273**, 5678-5684.
- Aranda, A. and Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, **81**, 1269-1304.
- Armstrong, L.C., Bjorkblom, B., Hankenson, K.D., Siadak, A.W., Stiles, C.E. and Bornstein, P. (2002) Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism. *Mol Biol Cell*, **13**, 1893-1905.
- Armstrong, L.C. and Bornstein, P. (2003) Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol*, **22**, 63-71.
- Aubert, J., Champigny, O., Saint-Marc, P., Negrel, R., Collins, S., Ricquier, D. and Ailhaud, G. (1997) Up-regulation of UCP-2 gene expression by PPAR agonists in preadipose and adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 606-611.
- Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Frering, V., Riou, J.P., Staels, B., Auwerx, J., Laville, M. and Vidal, H. (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*, **46**, 1319-1327.

- Aung, C.S., Faddy, H.M., Lister, E.J., Monteith, G.R. and Roberts-Thomson, S.J. (2006) Isoform specific changes in PPAR alpha and beta in colon and breast cancer with differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **340**, 656-660.
- Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E.S., Nelson, M.C., Olefsky, J.M., Boland, R. and Evans, R.M. (2002) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 303-308.
- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A. and Evans, R.M. (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, **4**, 585-595.
- Bastie, C., Luquet, S., Holst, D., Jehl-Pietri, C. and Grimaldi, P.A. (2000) Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation. *J Biol Chem*, **275**, 38768-38773.
- Bishop-Bailey, D. and Wray, J. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **71**, 1-22.
- Bistulfi, G., Pozzi, S., Ren, M., Rossetti, S. and Sacchi, N. (2006) A repressive epigenetic domino effect confers susceptibility to breast epithelial cell transformation: implications for predicting breast cancer risk. *Cancer Res*, **66**, 10308-10314.
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J.C., Staels, B. and Glineur, C. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *J Biol Chem*, **277**, 37254-37259.
- Bohman, S., Matsumoto, T., Suh, K., Dimberg, A., Jakobsson, L., Yuspa, S. and Claesson-Welsh, L. (2005) Proteomic analysis of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation reveals a role for chloride intracellular channel 4 (CLIC4) in tubular morphogenesis. *J Biol Chem*, **280**, 42397-42404.
- Boitier, E., Gautier, J.C. and Roberts, R. (2003) Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol*, **2**, 3.
- Bornstein, P., Armstrong, L.C., Hankenson, K.D., Kyriakides, T.R. and Yang, Z. (2000) Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biol*, **19**, 557-568.
- Bornstein, P. and Sage, E.H. (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 608-616.
- Braissant, O., Fougelle, F., Scotto, C., Dauca, M. and Wahli, W. (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, **137**, 354-366.
- Brandt, J.M., Djouadi, F. and Kelly, D.P. (1998) Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*, **273**, 23786-23792.
- Budhu, A.S. and Noy, N. (2002) Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol*, **22**, 2632-2641.
- Burdick, A.D., Bility, M.T., Girroir, E.E., Billin, A.N., Willson, T.M., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2007) Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta(PPARbeta/delta) inhibits cell growth of human N/TERT-1 keratinocytes. *Cell Signal*, **19**, 1163-1171.
- Burdick, A.D., Kim, D.J., Peraza, M.A., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2006) The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epithelial cell growth and differentiation. *Cell Signal*, **18**, 9-20.
- Carlberg, C. (2004) Principles of gene regulation by bioactive lipids through members of the nuclear receptor superfamily. *Research Signpost*, 77-95.
- Carlberg, C. and Dunlop, T.W. (2006) An integrated biological approach to nuclear receptor signaling in physiological control and disease. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **16**, 1-22.

- Castrillo, A. and Tontonoz, P. (2004) PPARs in atherosclerosis: the clot thickens. *J Clin Invest*, **114**, 1538-1540.
- Cazes, A., Galaup, A., Chomel, C., Bignon, M., Brechot, N., Le Jan, S., Weber, H., Corvol, P., Muller, L., Germain, S. and Monnot, C. (2006) Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ Res*, **99**, 1207-1215.
- Chang, K.H., Chan-Ling, T., McFarland, E.L., Afzal, A., Pan, H., Baxter, L.C., Shaw, L.C., Caballero, S., Sengupta, N., Li Calzi, S., Sullivan, S.M. and Grant, M.B. (2007) IGF binding protein-3 regulates hematopoietic stem cell and endothelial precursor cell function during vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10595-10600.
- Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., Evans, R.M. and Tontonoz, P. (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*, **7**, 161-171.
- Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D. and Lazar, M.A. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, **135**, 798-800.
- Chen, C.D., Wang, C.S., Huang, Y.H., Chien, K.Y., Liang, Y., Chen, W.J. and Lin, K.H. (2007) Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Proteomics*, **7**, 155-167.
- Chen, F., Law, S.W. and O'Malley, B.W. (1993) Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members. *Biochem Biophys Res Commun*, **196**, 671-677.
- Cheng, L., Ding, G., Qin, Q., Huang, Y., Lewis, W., He, N., Evans, R.M., Schneider, M.D., Brako, F.A., Xiao, Y., Chen, Y.E. and Yang, Q. (2004) Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med*, **10**, 1245-1250.
- Cheung, C., Akiyama, T.E., Ward, J.M., Nicol, C.J., Feigenbaum, L., Vinson, C. and Gonzalez, F.J. (2004) Diminished hepatocellular proliferation in mice humanized for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cancer Res*, **64**, 3849-3854.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A.T., Neve, B., Torra, I.P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H.B., Fruchart, J.C., Clavey, V. and Staels, B. (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*, **7**, 53-58.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S.M. and Barton, G.J. (2004) The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, **20**, 426-427.
- Coe, N.R. and Bernlohr, D.A. (1998) Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1391**, 287-306.
- Cullingford, T.E., Bhakoo, K., Peuchen, S., Dolphin, C.T., Patel, R. and Clark, J.B. (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem*, **70**, 1366-1375.
- Cvetkovic, D., Williams, S.J. and Hamilton, T.C. (2003) Loss of cellular retinol-binding protein 1 gene expression in microdissected human ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, **9**, 1013-1020.
- De Vos, P., Lefebvre, A.M., Miller, S.G., Guerre-Millo, M., Wong, K., Saladin, R., Hamann, L.G., Staels, B., Briggs, M.R. and Auwerx, J. (1996) Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest*, **98**, 1004-1009.
- Degenhardt, T., Matilainen, M., Herzig, K.H., Dunlop, T.W. and Carlberg, C. (2006) The insulin-like growth factor-binding protein 1 gene is a primary target of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem*, **281**, 39607-39619.

- Degenhardt, T., Saramaki, A., Malinen, M., Rieck, M., Vaisanen, S., Huotari, A., Herzig, K.H., Müller, R. and Carlberg, C. (2007) Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Mol Biol*, **372**, 341-355.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Fruchart, J.C., Haegeman, G. and Staels, B. (2002) DNA binding-independent induction of IkappaBalpha gene transcription by PPARalpha. *Mol Endocrinol*, **16**, 1029-1039.
- Delerive, P., Gervois, P., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2000) Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem*, **275**, 36703-36707.
- Desvergne, B. and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, **20**, 649-688.
- Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzalez, F.J. and Wahli, W. (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, **384**, 39-43.
- Di-Poi, N., Michalik, L., Tan, N.S., Desvergne, B. and Wahli, W. (2003) The anti-apoptotic role of PPARbeta contributes to efficient skin wound healing. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**, 257-265.
- Di-Poi, N., Tan, N.S., Michalik, L., Wahli, W. and Desvergne, B. (2002) Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell*, **10**, 721-733.
- Ding, N.Z., Ma, X.H., Diao, H.L., Xu, L.B. and Yang, Z.M. (2003a) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta at implantation sites and in decidual cells of rat uterus. *Reproduction*, **125**, 817-825.
- Ding, N.Z., Teng, C.B., Ma, H., Ni, H., Ma, X.H., Xu, L.B. and Yang, Z.M. (2003b) Peroxisome proliferator-activated receptor delta expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation and decidualization. *Mol Reprod Dev*, **66**, 218-224.
- DiRenzo, J., Soderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliastro, M.H., Ricote, M., Ingre, S., Horlein, A., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol*, **17**, 2166-2176.
- Djouadi, F., Weinheimer, C.J., Saffitz, J.E., Pitchford, C., Bastin, J., Gonzalez, F.J. and Kelly, D.P. (1998) A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest*, **102**, 1083-1091.
- Donato, L.J. and Noy, N. (2005) Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res*, **65**, 8193-8199.
- Donato, L.J., Suh, J.H. and Noy, N. (2007) Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res*, **67**, 609-615.
- Dong, D., Ruuska, S.E., Levinthal, D.J. and Noy, N. (1999) Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem*, **274**, 23695-23698.
- Dowell, P., Ishmael, J.E., Avram, D., Peterson, V.J., Nevriy, D.J. and Leid, M. (1997a) p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*, **272**, 33435-33443.
- Dowell, P., Peterson, V.J., Zabriskie, T.M. and Leid, M. (1997b) Ligand-induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha conformational change. *J Biol Chem*, **272**, 2013-2020.
- Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P. and Muscat, G.E. (2003) The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol*, **17**, 2477-2493.

- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, **68**, 879-887.
- Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C.A., Hayes, N., Leibowitz, M., Moller, D.E. and Berger, J. (1996) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun*, **224**, 431-437.
- Escher, P. and Wahli, W. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*, **448**, 121-138.
- Esteller, M. (2003) Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol*, **109**, 80-88.
- Evans, R.M., Barish, G.D. and Wang, Y.X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*, **10**, 355-361.
- Fauti, T., Müller-Brüsselbach, S., Kreutzer, M., Rieck, M., Meissner, W., Rapp, U., Schweer, H., Komhoff, M. and Müller, R. (2006) Induction of PPARbeta and prostacyclin (PGI₂) synthesis by Raf signaling: failure of PGI₂ to activate PPARbeta. *Febs J*, **273**, 170-179.
- Feige, J.N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B. and Wahli, W. (2006) From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*, **45**, 120-159.
- Feige, J.N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W. and Desvergne, B. (2005) Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem*, **280**, 17880-17890.
- Fernandez-Salas, E., Sagar, M., Cheng, C., Yuspa, S.H. and Weinberg, W.C. (1999) p53 and tumor necrosis factor alpha regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein. *J Biol Chem*, **274**, 36488-36497.
- Fernandez-Salas, E., Suh, K.S., Speransky, V.V., Bowers, W.L., Levy, J.M., Adams, T., Pathak, K.R., Edwards, L.E., Hayes, D.D., Cheng, C., Steven, A.C., Weinberg, W.C. and Yuspa, S.H. (2002) mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Mol Cell Biol*, **22**, 3610-3620.
- Firth, S.M. and Baxter, R.C. (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*, **23**, 824-854.
- Forman, B.M., Chen, J. and Evans, R.M. (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4312-4317.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. and Evans, R.M. (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, **83**, 803-812.
- Galaup, A., Cazes, A., Le Jan, S., Philippe, J., Connault, E., Le Coz, E., Mekid, H., Mir, L.M., Opolon, P., Corvol, P., Monnot, C. and Germain, S. (2006) Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18721-18726.
- Gaudel, C., Schwartz, C., Giordano, C., Abumrad, N.A. and Grimaldi, P. (2008) Pharmacological activation of PPAR{beta} promotes rapid and calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Gearing, K.L., Crickmore, A. and Gustafsson, J.A. (1994) Structure of the mouse peroxisome proliferator activated receptor alpha gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **199**, 255-263.
- Gearing, K.L., Gottlicher, M., Teboul, M., Widmark, E. and Gustafsson, J.A. (1993) Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1440-1444.
- Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B. and Wahli, W. (2005) Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 216-222.

- Gelman, L., Zhou, G., Fajas, L., Raspe, E., Fruchart, J.C. and Auwerx, J. (1999) p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. *J Biol Chem*, **274**, 7681-7688.
- Genini, D. and Catapano, C.V. (2006) Control of peroxisome proliferator-activated receptor fate by the ubiquitinproteasome system. *J Recept Signal Transduct Res*, **26**, 679-692.
- Genini, D. and Catapano, C.V. (2007) Block of nuclear receptor ubiquitination. A mechanism of ligand-dependent control of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity. *J Biol Chem*, **282**, 11776-11785.
- Gervois, P., Torra, I.P., Chinetti, G., Grotzinger, T., Dubois, G., Fruchart, J.C., Fruchart-Najib, J., Leitersdorf, E. and Staels, B. (1999) A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor alpha splice variant with dominant negative activity. *Mol Endocrinol*, **13**, 1535-1549.
- Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A. and Theocharis, S. (2008) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Ligands: Potential Pharmacological Agents for Targeting the Angiogenesis Signaling Cascade in Cancer. *PPAR Res*, **2008**, 431763.
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P. and Evans, R.M. (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, **330**, 624-629.
- Girroir, E.E., Hollingshead, H.E., Billin, A.N., Willson, T.M., Robertson, G.P., Sharma, A.K., Amin, S., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2008a) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands inhibit growth of UACC903 and MCF7 human cancer cell lines. *Toxicology*, **243**, 236-243.
- Girroir, E.E., Hollingshead, H.E., He, P., Zhu, B., Perdew, G.H. and Peters, J.M. (2008b) Quantitative expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) protein in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **371**, 456-461.
- Glinghammar, B., Skogsberg, J., Hamsten, A. and Ehrenborg, E. (2003) PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**, 361-368.
- Graham, T.L., Mookherjee, C., Suckling, K.E., Palmer, C.N. and Patel, L. (2005) The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis*, **181**, 29-37.
- Granneman, J., Skoff, R. and Yang, X. (1998) Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J Neurosci Res*, **51**, 563-573.
- Gray, J.P., Burns, K.A., Leas, T.L., Perdew, G.H. and Vanden Heuvel, J.P. (2005) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by protein kinase C. *Biochemistry*, **44**, 10313-10321.
- Gupta, R.A., Tan, J., Krause, W.F., Geraci, M.W., Willson, T.M., Dey, S.K. and DuBois, R.N. (2000) Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13275-13280.
- Gupta, R.A., Wang, D., Katkuri, S., Wang, H., Dey, S.K. and DuBois, R.N. (2004) Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med*, **10**, 245-247.
- Gurnell, M., Wentworth, J.M., Agostini, M., Adams, M., Collingwood, T.N., Provenzano, C., Browne, P.O., Rajanayagam, O., Burris, T.P., Schwabe, J.W., Lazar, M.A. and Chatterjee, V.K. (2000) A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis. *J Biol Chem*, **275**, 5754-5759.
- Gutierrez-Gonzalez, L.H., Ludwig, C., Hohoff, C., Rademacher, M., Hanhoff, T., Ruterjans, H., Spener, F. and Lucke, C. (2002) Solution structure and backbone dynamics of human epidermal-type fatty acid-binding protein (E-FABP). *Biochem J*, **364**, 725-737.
- Han, S., Ritzenthaler, J.D., Wingerd, B. and Roman, J. (2005) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) increases the expression of prostaglandin E2 receptor subtype EP4. The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem*, **280**, 33240-33249.

- Han, S., Ritzenthaler, J.D., Zheng, Y. and Roman, J. (2008) PPAR{beta}/{delta} agonist stimulates human lung carcinoma cell growth through inhibition of PTEN expression: the involvement of PI3-K and NF-{\kappa}B signals. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Hansen, J.B., Zhang, H., Rasmussen, T.H., Petersen, R.K., Flindt, E.N. and Kristiansen, K. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem*, **276**, 3175-3182.
- Harman, F.S., Nicol, C.J., Marin, H.E., Ward, J.M., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med*, **10**, 481-483.
- Hatae, T., Wada, M., Yokoyama, C., Shimonishi, M. and Tanabe, T. (2001) Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J Biol Chem*, **276**, 46260-46267.
- Hato, T., Tabata, M. and Oike, Y. (2008) The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med*, **18**, 6-14.
- Hauser, S., Adelmant, G., Sarraf, P., Wright, H.M., Mueller, E. and Spiegelman, B.M. (2000) Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem*, **275**, 18527-18533.
- He, T., Lu, T., d'Uscio, L.V., Lam, C.F., Lee, H.C. and Katusic, Z.S. (2008) Angiogenic Function of Prostacyclin Biosynthesis in Human Endothelial Progenitor Cells. *Circ Res*.
- He, T.C., Chan, T.A., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, **99**, 335-345.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **387**, 733-736.
- Helledie, T., Antonius, M., Sorensen, R.V., Hertz, A.V., Bernlohr, D.A., Kolvraa, S., Kristiansen, K. and Mandrup, S. (2000) Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J Lipid Res*, **41**, 1740-1751.
- Hellemans, K., Rombouts, K., Quartier, E., Dittie, A.S., Knorr, A., Michalik, L., Rogiers, V., Schuit, F., Wahli, W. and Geerts, A. (2003) PPARbeta regulates vitamin A metabolism-related gene expression in hepatic stellate cells undergoing activation. *J Lipid Res*, **44**, 280-295.
- Hermann, L.M., Pinkerton, M., Jennings, K., Yang, L., Grom, A., Sowders, D., Kersten, S., Witte, D.P., Hirsch, R. and Thornton, S. (2005) Angiopoietin-like-4 is a potential angiogenic mediator in arthritis. *Clin Immunol*, **115**, 93-101.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L. and Sistonen, L. (2003) Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol*, **23**, 2953-2968.
- Hihi, A.K., Michalik, L. and Wahli, W. (2002) PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 790-798.
- Hiscott, P., Paraoan, L., Choudhary, A., Ordonez, J.L., Al-Khaier, A. and Armstrong, D.J. (2006) Thrombospondin 1, thrombospondin 2 and the eye. *Prog Retin Eye Res*, **25**, 1-18.
- Hollingshead, H.E., Borland, M.G., Billin, A.N., Willson, T.M., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2007a) Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-{\beta}/{\delta} (PPAR{\beta}/{\delta}) and inhibition of cyclooxygenase-2 (COX2) attenuate colon carcinogenesis through independent signaling mechanisms. *Carcinogenesis*.
- Hollingshead, H.E., Killins, R.L., Borland, M.G., Giroir, E.E., Billin, A.N., Willson, T.M., Sharma, A.K., Amin, S., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2007b) Peroxisome proliferator-activated receptor-{\beta}/{\delta} (PPAR{\beta}/{\delta}) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. *Carcinogenesis*.
- Hollingshead, H.E., Killins, R.L., Borland, M.G., Giroir, E.E., Billin, A.N., Willson, T.M., Sharma, A.K., Amin, S., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2007c) Peroxisome proliferator-activated

- receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. *Carcinogenesis*, **28**, 2641-2649.
- Hsu, M.H., Palmer, C.N., Griffin, K.J. and Johnson, E.F. (1995) A single amino acid change in the mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha alters transcriptional responses to peroxisome proliferators. *Mol Pharmacol*, **48**, 559-567.
- Huang, J.S., Chao, C.C., Su, T.L., Yeh, S.H., Chen, D.S., Chen, C.T., Chen, P.J. and Jou, Y.S. (2004) Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 950-958.
- Hwa, V., Oh, Y. and Rosenfeld, R.G. (1997) Insulin-like growth factor binding protein-3 and -5 are regulated by transforming growth factor-beta and retinoic acid in the human prostate adenocarcinoma cell line PC-3. *Endocrine*, **6**, 235-242.
- Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W. and Desvergne, B. (1997) Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem*, **272**, 20108-20117.
- Ijpenberg, A., Tan, N.S., Gelman, L., Kersten, S., Seydoux, J., Xu, J., Metzger, D., Canaple, L., Chambon, P., Wahli, W. and Desvergne, B. (2004) In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *Embo J*, **23**, 2083-2091.
- Iruela-Arispe, M.L., Lombardo, M., Krutzsch, H.C., Lawler, J. and Roberts, D.D. (1999) Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation*, **100**, 1423-1431.
- Issemann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**, 645-650.
- Issemann, I., Prince, R., Tugwood, J. and Green, S. (1992) A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation? *Biochem Soc Trans*, **20**, 824-827.
- Issemann, I., Prince, R.A., Tugwood, J.D. and Green, S. (1993) The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrates hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol*, **11**, 37-47.
- Ito, Y., Oike, Y., Yasunaga, K., Hamada, K., Miyata, K., Matsumoto, S., Sugano, S., Tanihara, H., Masuho, Y. and Suda, T. (2003) Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. *Cancer Res*, **63**, 6651-6657.
- Jaeckel, E.C., Raja, S., Tan, J., Das, S.K., Dey, S.K., Girod, D.A., Tsue, T.T. and Sanford, T.R. (2001) Correlation of expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and peroxisome proliferator-activated receptor delta with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **127**, 1253-1259.
- Jerome, L., Shiry, L. and Leyland-Jones, B. (2003) Deregulation of the IGF axis in cancer: epidemiological evidence and potential therapeutic interventions. *Endocr Relat Cancer*, **10**, 561-578.
- Jerome, V. and Müller, R. (1998) Tissue-specific, cell cycle-regulated chimeric transcription factors for the targeting of gene expression to tumor cells. *Hum Gene Ther*, **9**, 2653-2659.
- Jeronimo, C., Henrique, R., Oliveira, J., Lobo, F., Pais, I., Teixeira, M.R. and Lopes, C. (2004) Aberrant cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) gene expression and promoter methylation in prostate cancer. *J Clin Pathol*, **57**, 872-876.
- Johnson, B.A., Wilson, E.M., Li, Y., Moller, D.E., Smith, R.G. and Zhou, G. (2000) Ligand-induced stabilization of PPARgamma monitored by NMR spectroscopy: implications for nuclear receptor activation. *J Mol Biol*, **298**, 187-194.
- Jones, P.S., Savory, R., Barratt, P., Bell, A.R., Gray, T.J., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. and Bell, D.R. (1995) Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur J Biochem*, **233**, 219-226.

- Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A.G., Wahli, W., Meier, C.A. and Desvergne, B. (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*, **272**, 25252-25259.
- Juge-Aubry, C.E., Gorla-Bajszczak, A., Pernin, A., Lemberger, T., Wahli, W., Burger, A.G. and Meier, C.A. (1995) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. Possible role of a leucine zipper-like heptad repeat. *J Biol Chem*, **270**, 18117-18122.
- Juge-Aubry, C.E., Hammar, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W.W., Burger, A.G. and Meier, C.A. (1999) Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem*, **274**, 10505-10510.
- Kang, H.Y., Chung, E., Lee, M., Cho, Y. and Kang, W.H. (2004) Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptors in human melanocytes. *Br J Dermatol*, **150**, 462-468.
- Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J.M. and Chambon, P. (1997) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*, **124**, 313-326.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. and Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res*, **33**, 511-518.
- Keller, H., Devchand, P.R., Perroud, M. and Wahli, W. (1997) PPAR alpha structure-function relationships derived from species-specific differences in responsiveness to hypolipidemic agents. *Biol Chem*, **378**, 651-655.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. and Wahli, W. (1993) Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2160-2164.
- Kersten, S., Mandard, S., Tan, N.S., Escher, P., Metzger, D., Chambon, P., Gonzalez, F.J., Desvergne, B. and Wahli, W. (2000) Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem*, **275**, 28488-28493.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B. and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*, **103**, 1489-1498.
- Kim, D.J., Akiyama, T.E., Harman, F.S., Burns, A.M., Shan, W., Ward, J.M., Kennett, M.J., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 23719-23727.
- Kim, D.J., Bility, M.T., Billin, A.N., Willson, T.M., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2006) PPARbeta/delta selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation. *Cell Death Differ*, **13**, 53-60.
- Kim, D.J., Murray, I.A., Burns, A.M., Gonzalez, F.J., Perdew, G.H. and Peters, J.M. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits epidermal cell proliferation by down-regulation of kinase activity. *J Biol Chem*, **280**, 9519-9527.
- Kim, H.J., Ham, S.A., Kim, S.U., Hwang, J.Y., Kim, J.H., Chang, K.C., Yabe-Nishimura, C., Kim, J.H. and Seo, H.G. (2008) Transforming growth factor-beta1 is a molecular target for the peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Circ Res*, **102**, 193-200.
- Kim, I., Kim, H.G., Kim, H., Kim, H.H., Park, S.K., Uhm, C.S., Lee, Z.H. and Koh, G.Y. (2000) Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis. *Biochem J*, **346 Pt 3**, 603-610.
- Kitareewan, S., Pitha-Rowe, I., Sekula, D., Lowrey, C.H., Nemeth, M.J., Golub, T.R., Freemantle, S.J. and Dmitrovsky, E. (2002) UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RARalpha degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3806-3811.

- Kleywegt, G.J., Bergfors, T., Senn, H., Le Motte, P., Gsell, B., Shudo, K. and Jones, T.A. (1994) Crystal structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with all-trans-retinoic acid and a synthetic retinoid. *Structure*, **2**, 1241-1258.
- Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K. and Evans, R.M. (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7355-7359.
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C. and Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, **83**, 813-819.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M. and Lehmann, J.M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4318-4323.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A. and Evans, R.M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, **358**, 771-774.
- Kockx, M., Gervois, P.P., Poulain, P., Derudas, B., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Princen, H.M., Kooistra, T. and Staels, B. (1999) Fibrates suppress fibrinogen gene expression in rodents via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Blood*, **93**, 2991-2998.
- Komar, C.M. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol*, **3**, 41.
- Komuves, L.G., Hanley, K., Lefebvre, A.M., Man, M.Q., Ng, D.C., Bikle, D.D., Williams, M.L., Elias, P.M., Auwerx, J. and Feingold, K.R. (2000a) Stimulation of PPARalpha promotes epidermal keratinocyte differentiation in vivo. *J Invest Dermatol*, **115**, 353-360.
- Komuves, L.G., Hanley, K., Man, M.Q., Elias, P.M., Williams, M.L. and Feingold, K.R. (2000b) Keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis: topical application of PPARalpha activators restores tissue homeostasis. *J Invest Dermatol*, **115**, 361-367.
- Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G. and Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, **11**, 779-791.
- Krogsdam, A.M., Nielsen, C.A., Neve, S., Holst, D., Helledie, T., Thomsen, B., Bendixen, C., Mandrup, S. and Kristiansen, K. (2002) Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation. *Biochem J*, **363**, 157-165.
- Kwong, J., Lo, K.W., Chow, L.S., To, K.F., Choy, K.W., Chan, F.L., Mok, S.C. and Huang, D.P. (2005) Epigenetic silencing of cellular retinol-binding proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Neoplasia*, **7**, 67-74.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Larsen, L.K., Amri, E.Z., Mandrup, S., Pacot, C. and Kristiansen, K. (2002) Genomic organization of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta gene: alternative promoter usage and splicing yield transcripts exhibiting differential translational efficiency. *Biochem J*, **366**, 767-775.
- Laudet, V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, **19**, 207-226.
- Lazennec, G., Canaple, L., Saugy, D. and Wahli, W. (2000) Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol*, **14**, 1962-1975.

- Le Jan, S., Amy, C., Cazes, A., Monnot, C., Lamande, N., Favier, J., Philippe, J., Sibony, M., Gasc, J.M., Corvol, P. and Germain, S. (2003) Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, **162**, 1521-1528.
- Lee, C.H., Chawla, A., Urbiztondo, N., Liao, D., Boisvert, W.A., Evans, R.M. and Curtiss, L.K. (2003a) Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*, **302**, 453-457.
- Lee, C.H., Kang, K., Mehl, I.R., Nofsinger, R., Alaynick, W.A., Chong, L.W., Rosenfeld, J.M. and Evans, R.M. (2006a) Peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes very low-density lipoprotein-derived fatty acid catabolism in the macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2434-2439.
- Lee, C.H., Olson, P. and Evans, R.M. (2003b) Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*, **144**, 2201-2207.
- Lee, C.H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L.W., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M. and Evans, R.M. (2006b) PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3444-3449.
- Lee, M.H., Reynisdottir, I. and Massague, J. (1995a) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*, **9**, 639-649.
- Lee, M.H. and Yang, H.Y. (2001) Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 1907-1922.
- Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H. and Gonzalez, F.J. (1995b) Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, **15**, 3012-3022.
- Lefebvre, A.M., Chen, I., Desreumaux, P., Najib, J., Fruchart, J.C., Geboes, K., Briggs, M., Heyman, R. and Auwerx, J. (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med*, **4**, 1053-1057.
- Leff, T. (2003) AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans*, **31**, 224-227.
- Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M. and Kliewer, S.A. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, **272**, 3406-3410.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M. and Kliewer, S.A. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, **270**, 12953-12956.
- Leibowitz, M.D., Fievet, C., Hennuyer, N., Peinado-Onsurbe, J., Duez, H., Bergera, J., Cullinan, C.A., Sparrow, C.P., Baffic, J., Berger, G.D., Santini, C., Marquis, R.W., Tolman, R.L., Smith, R.G., Moller, D.E. and Auwerx, J. (2000) Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett*, **473**, 333-336.
- Lemon, B., Inouye, C., King, D.S. and Tjian, R. (2001) Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature*, **414**, 924-928.
- Lewis, B.A. and Reinberg, D. (2003) The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J Cell Sci*, **116**, 3667-3675.
- Ley, C.D., Olsen, M.W., Lund, E.L. and Kristjansen, P.E. (2004) Angiogenic synergy of bFGF and VEGF is antagonized by Angiopoietin-2 in a modified in vivo Matrigel assay. *Microvasc Res*, **68**, 161-168.
- Li, A.C., Binder, C.J., Gutierrez, A., Brown, K.K., Plotkin, C.R., Pattison, J.W., Valledor, A.F., Davis, R.A., Willson, T.M., Witztum, J.L., Palinski, W. and Glass, C.K. (2004) Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*, **114**, 1564-1576.

- Li, A.C., Brown, K.K., Silvestre, M.J., Willson, T.M., Palinski, W. and Glass, C.K. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, **106**, 523-531.
- Lim, H. and Dey, S.K. (2000) PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 137-142.
- Lim, H., Gupta, R.A., Ma, W.G., Paria, B.C., Moller, D.E., Morrow, J.D., DuBois, R.N., Trzaskos, J.M. and Dey, S.K. (1999) Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev*, **13**, 1561-1574.
- Lim, H.J., Moon, I. and Han, K. (2004) Transcriptional cofactors exhibit differential preference toward peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta in uterine cells. *Endocrinology*, **145**, 2886-2895.
- Liou, J.Y., Lee, S., Ghelani, D., Matijevic-Aleksic, N. and Wu, K.K. (2006) Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 1481-1487.
- Loffek, S., Zigrino, P. and Mauch, C. (2006) [Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion and metastasis]. *J Dtsch Dermatol Ges*, **4**, 496-502; quiz 503.
- Loudig, O., Babichuk, C., White, J., Abu-Abed, S., Mueller, C. and Petkovich, M. (2000) Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol*, **14**, 1483-1497.
- Lundell, K., Thulin, P., Hamsten, A. and Ehrenborg, E. (2007) Alternative splicing of human peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR delta): effects on translation efficiency and trans-activation ability. *BMC Mol Biol*, **8**, 70.
- Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M. and Grimaldi, P.A. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *Faseb J*, **17**, 2299-2301.
- Mader, S., Chen, J.Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1993) The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *Embo J*, **12**, 5029-5041.
- Maggiora, M., Bologna, M., Ceru, M.P., Possati, L., Angelucci, A., Cimini, A., Miglietta, A., Bozzo, F., Margiotta, C., Muzio, G. and Canuto, R.A. (2004) An overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. *Int J Cancer*, **112**, 909-919.
- Man, M.Q., Barish, G.D., Schmutz, M., Crumrine, D., Barak, Y., Chang, S., Jiang, Y., Evans, R.M., Elias, P.M. and Feingold, K.R. (2008) Deficiency of PPARbeta/delta in the epidermis results in defective cutaneous permeability barrier homeostasis and increased inflammation. *J Invest Dermatol*, **128**, 370-377.
- Mandard, S., Muller, M. and Kersten, S. (2004a) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 393-416.
- Mandard, S., Zandbergen, F., Tan, N.S., Escher, P., Patsouris, D., Koenig, W., Kleemann, R., Bakker, A., Veenman, F., Wahli, W., Muller, M. and Kersten, S. (2004b) The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *J Biol Chem*, **279**, 34411-34420.
- Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R.M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.
- Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Kliewer, S.A., Borgmeyer, U., Ong, E.S. and Evans, R.M. (1991) A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell*, **66**, 555-561.

- Manor, D., Shmidt, E.N., Budhu, A., Flesken-Nikitin, A., Zgola, M., Page, R., Nikitin, A.Y. and Noy, N. (2003) Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. *Cancer Res*, **63**, 4426-4433.
- Marin, H.E., Peraza, M.A., Billin, A.N., Willson, T.M., Ward, J.M., Kennett, M.J., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2006) Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis. *Cancer Res*, **66**, 4394-4401.
- Martens, J.A. and Winston, F. (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 136-142.
- Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B. and Auwerx, J. (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem*, **272**, 28210-28217.
- Martinasso, G., Maggiora, M., Trombetta, A., Canuto, R.A. and Muzio, G. (2006) Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate, a widely used peroxisome proliferator and plasticizer, on cell growth in the human keratinocyte cell line NCTC 2544. *J Toxicol Environ Health A*, **69**, 353-365.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*, **9**, 650-662.
- Matsusue, K., Peters, J.M. and Gonzalez, F.J. (2004) PPARbeta/delta potentiates PPARgamma-stimulated adipocyte differentiation. *Faseb J*, **18**, 1477-1479.
- Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O'Rahilly, S., Palmer, C.N., Plutzky, J., Reddy, J.K., Spiegelman, B.M., Staels, B. and Wahli, W. (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 726-741.
- Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N.S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J., Peters, J.M., Kaya, G., Gonzalez, F.J., Zakany, J., Metzger, D., Chambon, P., Duboule, D. and Wahli, W. (2001) Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol*, **154**, 799-814.
- Michalik, L., Desvergne, B. and Wahli, W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*, **4**, 61-70.
- Michalik, L. and Wahli, W. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 991-998.
- Michalik, L., Zoete, V., Krey, G., Grosdidier, A., Gelman, L., Chodanowski, P., Feige, J.N., Desvergne, B., Wahli, W. and Michielin, O. (2007) Combined simulation and mutagenesis analyses reveal the involvement of key residues for peroxisome proliferator-activated receptor alpha helix 12 dynamic behavior. *J Biol Chem*, **282**, 9666-9677.
- Miles, P.D., Romeo, O.M., Higo, K., Cohen, A., Rafaat, K. and Olefsky, J.M. (1997) TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes*, **46**, 1678-1683.
- Molnar, F., Matilainen, M. and Carlberg, C. (2005) Structural determinants of the agonist-independent association of human peroxisome proliferator-activated receptors with coactivators. *J Biol Chem*, **280**, 26543-26556.
- Molotkov, A., Ghyselinck, N.B., Chambon, P. and Duester, G. (2004) Opposing actions of cellular retinol-binding protein and alcohol dehydrogenase control the balance between retinol storage and degradation. *Biochem J*, **383**, 295-302.
- Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S. and Ceru, M.P. (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, **123**, 131-145.
- Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J. and Latruffe, N. (1998) Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*, **273**, 16710-16714.
- Muerhoff, A.S., Griffin, K.J. and Johnson, E.F. (1992) The peroxisome proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, by clofibrate. *J Biol Chem*, **267**, 19051-19053.

- Müller-Brüsselbach, S., Ebrahimsade, S., Jakel, J., Eckhardt, J., Rapp, U.R., Peters, J.M., Moll, R. and Müller, R. (2007a) Growth of transgenic RAF-induced lung adenomas is increased in mice with a disrupted PPARbeta/delta gene. *Int J Oncol*, **31**, 607-611.
- Müller-Brüsselbach, S., Komhoff, M., Rieck, M., Meissner, W., Kaddatz, K., Adamkiewicz, J., Keil, B., Klose, K.J., Moll, R., Burdick, A.D., Peters, J.M. and Müller, R. (2007b) Deregulation of tumor angiogenesis and blockade of tumor growth in PPARbeta-deficient mice. *Embo J*, **26**, 3686-3698.
- Nadra, K., Anghel, S.I., Joye, E., Tan, N.S., Basu-Modak, S., Trono, D., Wahli, W. and Desvergne, B. (2006) Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol*, **26**, 3266-3281.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H. and Evans, R.M. (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, **93**, 229-240.
- Nettelbeck, D.M., Jerome, V. and Müller, R. (1999) A dual specificity promoter system combining cell cycle-regulated and tissue-specific transcriptional control. *Gene Ther*, **6**, 1276-1281.
- Nicol, C.J., Yoon, M., Ward, J.M., Yamashita, M., Fukamachi, K., Peters, J.M. and Gonzalez, F.J. (2004) PPARgamma influences susceptibility to DMBA-induced mammary, ovarian and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **25**, 1747-1755.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K. and Milburn, M.V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, **395**, 137-143.
- Noy, N. (2000) Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J*, **348 Pt 3**, 481-495.
- NR-Nomenclature. (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, **97**, 161-163.
- Oh, Y., Muller, H.L., Ng, L. and Rosenfeld, R.G. (1995) Transforming growth factor-beta-induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J Biol Chem*, **270**, 13589-13592.
- Ohshima, T., Koga, H. and Shimotohno, K. (2004) Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, **279**, 29551-29557.
- Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Ohsugi, M., Kubota, T., Fujiu, K., Maemura, K., Kubota, N., Kadowaki, T. and Nagai, R. (2008) SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat Med*, **14**, 656-666.
- Oliver, W.R., Jr., Shenk, J.L., Snaith, M.R., Russell, C.S., Plunket, K.D., Bodkin, N.L., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Sznaidman, M.L., Lambert, M.H., Xu, H.E., Sternbach, D.D., Kliewer, S.A., Hansen, B.C. and Willson, T.M. (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5306-5311.
- Padua, D., Zhang, X.H., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W.L., Gomis, R.R. and Massague, J. (2008) TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*, **133**, 66-77.
- Palmer, C.N., Hsu, M.H., Griffin, H.J. and Johnson, E.F. (1995) Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J Biol Chem*, **270**, 16114-16121.
- Park, B.H., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2001) Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2598-2603.
- Park, D.J., Chumakov, A.M., Vuong, P.T., Chih, D.Y., Gombart, A.F., Miller, W.H., Jr. and Koeffler, H.P. (1999) CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. *J Clin Invest*, **103**, 1399-1408.
- Pasceri, V., Wu, H.D., Willerson, J.T. and Yeh, E.T. (2000) Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation*, **101**, 235-238.

- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (2005) A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*, **437**, 759-763.
- Pelton, P. (2006) GW-501516 GlaxoSmithKline/Ligand. *Curr Opin Investig Drugs*, **7**, 360-370.
- Peraldi, P., Xu, M. and Spiegelman, B.M. (1997) Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest*, **100**, 1863-1869.
- Peters, J.M., Hennuyer, N., Staels, B., Fruchart, J.C., Fievet, C., Gonzalez, F.J. and Auwerx, J. (1997) Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem*, **272**, 27307-27312.
- Peters, J.M., Lee, S.S., Li, W., Ward, J.M., Gavriloiva, O., Everett, C., Reitman, M.L., Hudson, L.D. and Gonzalez, F.J. (2000) Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*, **20**, 5119-5128.
- Piqueras, L., Reynolds, A.R., Hodivala-Dilke, K.M., Alfranca, A., Redondo, J.M., Hatae, T., Tanabe, T., Warner, T.D. and Bishop-Bailey, D. (2007) Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 63-69.
- Planavila, A., Rodriguez-Calvo, R., Jove, M., Michalik, L., Wahli, W., Laguna, J.C. and Vazquez-Carrera, M. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, **65**, 832-841.
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B. and Spiegelman, B.M. (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, **286**, 1368-1371.
- Rajah, R., Valentinis, B. and Cohen, P. (1997) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem*, **272**, 12181-12188.
- Reed, K.R., Sansom, O.J., Hayes, A.J., Gescher, A.J., Winton, D.J., Peters, J.M. and Clarke, A.R. (2004) PPARdelta status and Apc-mediated tumourigenesis in the mouse intestine. *Oncogene*, **23**, 8992-8996.
- Ricote, M., Huang, J.T., Welch, J.S. and Glass, C.K. (1999) The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol*, **66**, 733-739.
- Rieck, M., Meissner, W., Ries, S., Müller-Brüsselbach, S. and Müller, R. (2008; submitted) Ligand-mediated regulation of PPAR β/δ : a comparative analysis of PPAR-selective agonists and all-trans retinoic acid (atRA).
- Rieck, M., Wedeken, L., Müller-Brüsselbach, S., Meissner, W. and Müller, R. (2007) Expression level and agonist-binding affect the turnover, ubiquitination and complex formation of peroxisome proliferator activated receptor beta. *Febs J*, **274**, 5068-5076.
- Roberts, D., Williams, S.J., Cvetkovic, D., Weinstein, J.K., Godwin, A.K., Johnson, S.W. and Hamilton, T.C. (2002) Decreased expression of retinol-binding proteins is associated with malignant transformation of the ovarian surface epithelium. *DNA Cell Biol*, **21**, 11-19.
- Rochette-Egly, C. and Chambon, P. (2001) F9 embryocarcinoma cells: a cell autonomous model to study the functional selectivity of RARs and RXRs in retinoid signaling. *Histol Histopathol*, **16**, 909-922.
- Ronnov-Jessen, L., Villadsen, R., Edwards, J.C. and Petersen, O.W. (2002) Differential expression of a chloride intracellular channel gene, CLIC4, in transforming growth factor-beta1-mediated conversion of fibroblasts to myofibroblasts. *Am J Pathol*, **161**, 471-480.
- Rosen, E.D. and Spiegelman, B.M. (2001) PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*, **276**, 37731-37734.
- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, **14**, 1293-1307.

- Sabatino, L., Casamassimi, A., Peluso, G., Barone, M.V., Capaccio, D., Migliore, C., Bonelli, P., Pedicini, A., Febbraro, A., Ciccodicola, A. and Colantuoni, V. (2005) A novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoform with dominant negative activity generated by alternative splicing. *J Biol Chem*, **280**, 26517-26525.
- Saez, E., Rosenfeld, J., Livolsi, A., Olson, P., Lombardo, E., Nelson, M., Banayo, E., Cardiff, R.D., Izpisua-Belmonte, J.C. and Evans, R.M. (2004) PPAR gamma signaling exacerbates mammary gland tumor development. *Genes Dev*, **18**, 528-540.
- Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G., Ming, U.T., Baird, S.M., Thomazy, V.A. and Evans, R.M. (1998) Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med*, **4**, 1058-1061.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Saluja, I., Granneman, J.G. and Skoff, R.P. (2001) PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia*, **33**, 191-204.
- Sambrook, J.F., E.F.; Maniatis, T. . (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*.
- Samuelsson, M.K., Pazirandeh, A., Davani, B. and Okret, S. (1999) p57Kip2, a glucocorticoid-induced inhibitor of cell cycle progression in HeLa cells. *Mol Endocrinol*, **13**, 1811-1822.
- Sato, O., Kuriki, C., Fukui, Y. and Motojima, K. (2002) Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem*, **277**, 15703-15711.
- Schaefer, K.L., Wada, K., Takahashi, H., Matsushashi, N., Ohnishi, S., Wolfe, M.M., Turner, J.R., Nakajima, A., Borkan, S.C. and Saubermann, L.J. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, **65**, 2251-2259.
- Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Shinar, D. and Rodan, G.A. (1992) Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol*, **6**, 1634-1641.
- Schmuth, M., Haqq, C.M., Cairns, W.J., Holder, J.C., Dorsam, S., Chang, S., Lau, P., Fowler, A.J., Chuang, G., Moser, A.H., Brown, B.E., Mao-Qiang, M., Uchida, Y., Schoonjans, K., Auwerx, J., Chambon, P., Willson, T.M., Elias, P.M. and Feingold, K.R. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **122**, 971-983.
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. and Auwerx, J. (1996) PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J*, **15**, 5336-5348.
- Schug, T.T., Berry, D.C., Shaw, N.S., Travis, S.N. and Noy, N. (2007) Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell*, **129**, 723-733.
- Schug, T.T., Berry, D.C., Toshkov, I.A., Cheng, L., Nikitin, A.Y. and Noy, N. (2008) Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARbeta/delta to RAR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 7546-7551.
- Sertznig, P., Seifert, M., Tilgen, W. and Reichrath, J. (2007) Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. *J Cell Physiol*, **212**, 1-12.
- Sfeir, Z., Ibrahimi, A., Amri, E., Grimaldi, P. and Abumrad, N. (1997) Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **57**, 17-21.
- Shao, D. and Lazar, M.A. (1997) Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **272**, 21473-21478.

- Shaw, N., Elholm, M. and Noy, N. (2003) Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem*, **278**, 41589-41592.
- Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W. and Gonzalez, F.J. (1993) cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, **32**, 5598-5604.
- Shi, Y., Hon, M. and Evans, R.M. (2002) The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2613-2618.
- Shibuya, A., Wada, K., Nakajima, A., Saeki, M., Katayama, K., Mayumi, T., Kadowaki, T., Niwa, H. and Kamisaki, Y. (2002) Nitration of PPARgamma inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBS Lett*, **525**, 43-47.
- Shiio, Y., Suh, K.S., Lee, H., Yuspa, S.H., Eisenman, R.N. and Aebersold, R. (2006) Quantitative proteomic analysis of myc-induced apoptosis: a direct role for Myc induction of the mitochondrial chloride ion channel, mtCLIC/CLIC4. *J Biol Chem*, **281**, 2750-2756.
- Shojima, N., Sakoda, H., Ogiwara, T., Fujishiro, M., Katagiri, H., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Inukai, K., Abe, M., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. and Asano, T. (2002) Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes*, **51**, 1737-1744.
- Shuman, S. (1991) Site-specific interaction of vaccinia virus topoisomerase I with duplex DNA. Minimal DNA substrate for strand cleavage in vitro. *J Biol Chem*, **266**, 20576-20577.
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*, **269**, 32678-32684.
- Skogsberg, J., Kannisto, K., Roshani, L., Gagne, E., Hamsten, A., Larsson, C. and Ehrenborg, E. (2000) Characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor delta gene and its expression. *Int J Mol Med*, **6**, 73-81.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Spiegelman, B.M. (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, **47**, 507-514.
- Spiegelman, B.M. and Flier, J.S. (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, **104**, 531-543.
- Staels, B. and Fruchart, J.C. (2005) Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*, **54**, 2460-2470.
- Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebreton, M., Torra, I.P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.C., Najib, J., Macclouf, J. and Tedgui, A. (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*, **393**, 790-793.
- Stanley, T.B., Leesnitzer, L.M., Montana, V.G., Galardi, C.M., Lambert, M.H., Holt, J.A., Xu, H.E., Moore, L.B., Blanchard, S.G. and Stimmel, J.B. (2003) Subtype specific effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands on corepressor affinity. *Biochemistry*, **42**, 9278-9287.
- Stephen, R.L., Gustafsson, M.C., Jarvis, M., Tatoud, R., Marshall, B.R., Knight, D., Ehrenborg, E., Harris, A.L., Wolf, C.R. and Palmer, C.N. (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res*, **64**, 3162-3170.
- Storch, J. and Thumser, A.E. (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1486**, 28-44.
- Suchanek, K.M., May, F.J., Lee, W.J., Holman, N.A. and Roberts-Thomson, S.J. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor beta expression in human breast epithelial cell lines of tumorigenic and non-tumorigenic origin. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1051-1058.
- Suh, K.S., Malik, M., Shukla, A. and Yuspa, S.H. (2007a) CLIC4, skin homeostasis and cutaneous cancer: surprising connections. *Mol Carcinog*, **46**, 599-604.

- Suh, K.S., Mutoh, M., Gerdes, M. and Yuspa, S.H. (2005) CLIC4, an intracellular chloride channel protein, is a novel molecular target for cancer therapy. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **10**, 105-109.
- Suh, K.S., Mutoh, M., Mutoh, T., Li, L., Ryscavage, A., Crutchley, J.M., Dumont, R.A., Cheng, C. and Yuspa, S.H. (2007b) CLIC4 mediates and is required for Ca²⁺-induced keratinocyte differentiation. *J Cell Sci*, **120**, 2631-2640.
- Suh, K.S., Mutoh, M., Nagashima, K., Fernandez-Salas, E., Edwards, L.E., Hayes, D.D., Crutchley, J.M., Marin, K.G., Dumont, R.A., Levy, J.M., Cheng, C., Garfield, S. and Yuspa, S.H. (2004) The organellar chloride channel protein CLIC4/mtCLIC translocates to the nucleus in response to cellular stress and accelerates apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 4632-4641.
- Suh, K.S. and Yuspa, S.H. (2005) Intracellular chloride channels: critical mediators of cell viability and potential targets for cancer therapy. *Curr Pharm Des*, **11**, 2753-2764.
- Sun, H.J., Bahk, Y.Y., Choi, Y.R., Shim, J.H., Han, S.H. and Lee, J.W. (2006) A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J Orthop Res*, **24**, 2059-2071.
- Suzuki, M., Toyooka, S., Shivapurkar, N., Shigematsu, H., Miyajima, K., Takahashi, T., Stastny, V., Zern, A.L., Fujisawa, T., Pass, H.I., Carbone, M. and Gazdar, A.F. (2005) Aberrant methylation profile of human malignant mesotheliomas and its relationship to SV40 infection. *Oncogene*, **24**, 1302-1308.
- Takahashi, T., Shivapurkar, N., Riquelme, E., Shigematsu, H., Reddy, J., Suzuki, M., Miyajima, K., Zhou, X., Bekele, B.N., Gazdar, A.F. and Wistuba, II. (2004) Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in gallbladder carcinoma and chronic cholecystitis. *Clin Cancer Res*, **10**, 6126-6133.
- Tan, N.S., Icre, G., Montagner, A., Bordier-ten-Heggeler, B., Wahli, W. and Michalik, L. (2007) The nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta potentiates cell chemotaxis, polarization, and migration. *Mol Cell Biol*, **27**, 7161-7175.
- Tan, N.S., Michalik, L., Desvergne, B. and Wahli, W. (2005) Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **93**, 99-105.
- Tan, N.S., Michalik, L., Di-Poi, N., Desvergne, B. and Wahli, W. (2004) Critical roles of the nuclear receptor PPARbeta (peroxisome-proliferator-activated receptor beta) in skin wound healing. *Biochem Soc Trans*, **32**, 97-102.
- Tan, N.S., Michalik, L., Noy, N., Yasmin, R., Pacot, C., Heim, M., Fluhmann, B., Desvergne, B. and Wahli, W. (2001) Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev*, **15**, 3263-3277.
- Tan, N.S., Shaw, N.S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., Wahli, W. and Noy, N. (2002) Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol*, **22**, 5114-5127.
- Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T. and Sakai, J. (2003) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15924-15929.
- Theocharis, S., Margeli, A., Vielh, P. and Kouraklis, G. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators. *Cancer Treat Rev*, **30**, 545-554.
- Thuillier, P., Anchirai, G.J., Nickel, K.P., Maldve, R.E., Gimenez-Conti, I., Muga, S.J., Liu, K.L., Fischer, S.M. and Belury, M.A. (2000) Activators of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha partially inhibit mouse skin tumor promotion. *Mol Carcinog*, **29**, 134-142.
- Tong, B.J., Tan, J., Tajeda, L., Das, S.K., Chapman, J.A., DuBois, R.N. and Dey, S.K. (2000) Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-delta in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia*, **2**, 483-490.

- Tontonoz, P., Graves, R.A., Budavari, A.I., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Hu, E., Tempst, P. and Spiegelman, B.M. (1994a) Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5628-5634.
- Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. (1994b) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, **79**, 1147-1156.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A. and Evans, R.M. (1998) PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, **93**, 241-252.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L. and Green, S. (1992) The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *Embo J*, **11**, 433-439.
- Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L. and Berkenstam, A. (1998) Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem*, **273**, 31108-31112.
- van Bilsen, M., van der Vusse, G.J., Gilde, A.J., Lindhout, M. and van der Lee, K.A. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression. *Mol Cell Biochem*, **239**, 131-138.
- van der Veen, J.N., Kruit, J.K., Havinga, R., Baller, J.F., Chimini, G., Lestavel, S., Staels, B., Groot, P.H., Groen, A.K. and Kuipers, F. (2005) Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *J Lipid Res*, **46**, 526-534.
- Varnat, F., Heggeler, B.B., Grisel, P., Boucard, N., Cortesby-Theulaz, I., Wahli, W. and Desvergne, B. (2006) PPARbeta/delta regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway. *Gastroenterology*, **131**, 538-553.
- Veerkamp, J.H. and Maatman, R.G. (1995) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res*, **34**, 17-52.
- Volpert, O.V. (2000) Modulation of endothelial cell survival by an inhibitor of angiogenesis thrombospondin-1: a dynamic balance. *Cancer Metastasis Rev*, **19**, 87-92.
- Vosper, H., Patel, L., Graham, T.L., Khoudoli, G.A., Hill, A., Macphee, C.H., Pinto, I., Smith, S.A., Suckling, K.E., Wolf, C.R. and Palmer, C.N. (2001) The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem*, **276**, 44258-44265.
- Vu-Dac, N., Chopin-Delannoy, S., Gervois, P., Bonnelye, E., Martin, G., Fruchart, J.C., Laudet, V. and Staels, B. (1998) The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem*, **273**, 25713-25720.
- Wakino, S., Kintscher, U., Kim, S., Yin, F., Hsueh, W.A. and Law, R.E. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1-> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **275**, 22435-22441.
- Wallace, J.M., Schwarz, M., Coward, P., Houze, J., Sawyer, J.K., Kelley, K.L., Chai, A. and Rudel, L.L. (2005) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonists on HDL-cholesterol in vervet monkeys. *J Lipid Res*, **46**, 1009-1016.
- Wang, D., Wang, H., Guo, Y., Ning, W., Katkuri, S., Wahli, W., Desvergne, B., Dey, S.K. and DuBois, R.N. (2006) Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19069-19074.
- Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Wahli, W., Desvergne, B., Das, S.K., Dey, S.K. and DuBois, R.N. (2004a) Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell*, **6**, 285-295.
- Wang, Y.X., Lee, C.H., Tiep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H. and Evans, R.M. (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, **113**, 159-170.

- Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H. and Evans, R.M. (2004b) Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*, **2**, e294.
- Wedeken, L. (2006) Untersuchungen zu Protein-Protein Interaktionen von u□berexprimiertem mPPARb. *Diplomarbeit, IMT Universität Marburg*.
- Westergaard, M., Henningsen, J., Svendsen, M.L., Johansen, C., Jensen, U.B., Schroder, H.D., Kratchmarova, I., Berge, R.K., Iversen, L., Bolund, L., Kragballe, K. and Kristiansen, K. (2001) Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid. *J Invest Dermatol*, **116**, 702-712.
- Wolfrum, C. (2007) Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 2465-2476.
- Wolfrum, C., Borrmann, C.M., Borchers, T. and Spener, F. (2001) Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2323-2328.
- Woods, C.G., Heuvel, J.P. and Rusyn, I. (2007) Genomic profiling in nuclear receptor-mediated toxicity. *Toxicol Pathol*, **35**, 474-494.
- Woods, J.W., Tanen, M., Figueroa, D.J., Biswas, C., Zycband, E., Moller, D.E., Austin, C.P. and Berger, J.P. (2003) Localization of PPARdelta in murine central nervous system: expression in oligodendrocytes and neurons. *Brain Res*, **975**, 10-21.
- Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J. and Spiegelman, B.M. (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, **3**, 151-158.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. and Gronemeyer, H. (1996) A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol*, **3**, 87-94.
- Xing, G., Zhang, L., Zhang, L., Heynen, T., Yoshikawa, T., Smith, M., Weiss, S. and Detera-Wadleigh, S. (1995) Rat PPAR delta contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei. *Biochem Biophys Res Commun*, **217**, 1015-1025.
- Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., Kliewer, S.A. and Milburn, M.V. (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*, **3**, 397-403.
- Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Plunket, K.D., Moore, L.B., Collins, J.L., Oplinger, J.A., Kliewer, S.A., Gampe, R.T., Jr., McKee, D.D., Moore, J.T. and Willson, T.M. (2001) Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13919-13924.
- Xu, L., Han, C., Lim, K. and Wu, T. (2006a) Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and cytosolic phospholipase A(2)alpha/cyclooxygenase-2/prostaglandin E(2) signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, **66**, 11859-11868.
- Xu, L., Han, C. and Wu, T. (2006b) A novel positive feedback loop between peroxisome proliferator-activated receptor-delta and prostaglandin E2 signaling pathways for human cholangiocarcinoma cell growth. *J Biol Chem*, **281**, 33982-33996.
- Yang, L., Zhou, Z.G., Zheng, X.L., Wang, L., Yu, Y.Y., Zhou, B., Gu, J. and Li, Y. (2008a) RNA interference against peroxisome proliferator-activated receptor delta gene promotes proliferation of human colorectal cancer cells. *Dis Colon Rectum*, **51**, 318-326; discussion 326-318.
- Yang, W., Rachez, C. and Freedman, L.P. (2000) Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol Cell Biol*, **20**, 8008-8017.
- Yang, Y.H., Wang, Y., Lam, K.S., Yau, M.H., Cheng, K.K., Zhang, J., Zhu, W., Wu, D. and Xu, A. (2008b) Suppression of the Raf/MEK/ERK signaling cascade and inhibition of angiogenesis by

- the carboxyl terminus of angiopoietin-like protein 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, 835-840.
- Yasmin, R., Yeung, K.T., Chung, R.H., Gaczynska, M.E., Osmulski, P.A. and Noy, N. (2004) DNA-looping by RXR tetramers permits transcriptional regulation "at a distance". *J Mol Biol*, **343**, 327-338.
- Yoon, J.C., Chickering, T.W., Rosen, E.D., Dussault, B., Qin, Y., Soukas, A., Friedman, J.M., Holmes, W.E. and Spiegelman, B.M. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol*, **20**, 5343-5349.
- Young, P.W., Cawthorne, M.A., Coyle, P.J., Holder, J.C., Holman, G.D., Kozka, I.J., Kirkham, D.M., Lister, C.A. and Smith, S.A. (1995) Repeat treatment of obese mice with BRL 49653, a new potent insulin sensitizer, enhances insulin action in white adipocytes. Association with increased insulin binding and cell-surface GLUT4 as measured by photoaffinity labeling. *Diabetes*, **44**, 1087-1092.
- Yu, C., Markan, K., Temple, K.A., Deplewski, D., Brady, M.J. and Cohen, R.N. (2005) The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **280**, 13600-13605.
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C.B., Harding, H.P., Ravera, C.P., McMahon, G., Brown, M. and Lazar, M.A. (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem*, **270**, 23975-23983.
- Zhang, P., Liegeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A. and Elledge, S.J. (1997) Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature*, **387**, 151-158.
- Zhang, X.K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M.I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P. and Pfahl, M. (1992) Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature*, **358**, 587-591.
- Zhu, Y., Alvares, K., Huang, Q., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (1993) Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem*, **268**, 26817-26820.
- Zhu, Y., Qi, C., Jain, S., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (1997) Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*, **272**, 25500-25506.
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 7921-7925.
- Zomer, A.W., van Der Burg, B., Jansen, G.A., Wanders, R.J., Poll-The, B.T. and van Der Saag, P.T. (2000) Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Lipid Res*, **41**, 1801-1807.
- Zuo, X., Wu, Y., Morris, J.S., Stimmel, J.B., Leesnitzer, L.M., Fischer, S.M., Lippman, S.M. and Shureiqi, I. (2006) Oxidative metabolism of linoleic acid modulates PPAR-beta/delta suppression of PPAR-gamma activity. *Oncogene*, **25**, 1225-1241.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

An der Johannes Gutenberg Universität Mainz:

Bartenschlager, Blessing, Burmester, Decker, Dräger, Epe, Hankeln, Heil, Kadereit, König, Kurzik-Dumke, Markel, Ochs, Paulsen, Pfeifer, Platt, Richter, Rühle, Schmidt, Stelzer, Technau, Unden, Urban, Veith, Wegener, Wehr, Wernicke, Werth, Zabel, Zerbe

An der „Chinese Academy of Science“ Shanghai (VR China):

Hennig

Am IMT der Philipps Universität Marburg:

Adamkiewicz, Meißner, Müller ,Müller-Brüsselbach

8.3 Publikationen

- Rieck, M.*, Meissner, W.,* Ries, S., Müller-Brüsselbach, S. and Müller, R.; *Ligand-mediated regulation of PPAR β/δ : a comparative analysis of PPAR-selective agonists and all-trans retinoic acid (atRA)*. (submitted 2008)
- Rieck M*, Wedeken L*, Müller-Brüsselbach S, Meissner W, Müller R. *Expression level and agonist-binding affect the turnover, ubiquitination and complex formation of peroxisome proliferator activated receptor beta*. FEBS J. 2007 Oct;274(19):5068-76. Epub 2007 Sep 4.
- Degenhardt T, Saramaki A, Malinen M, Rieck M, Vaisanen S, Huotari A, Herzig KH, Müller R, Carlberg C. *Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta*. J Mol Biol. 2007 Sep 14;372(2):341-55. Epub 2007 Jul 19.
- Müller-Brüsselbach S*, Komhoff M*, Rieck M*, Meissner W, Kaddatz K, Adamkiewicz J, Keil B, Klose KJ, Moll R, Burdick AD, Peters JM, Müller R. *Deregulation of tumor angiogenesis and blockade of tumor growth in PPARbeta-deficient mice*. EMBO J. 2007 Aug 8;26(15):3686-98. Epub 2007 Jul 19.
- Adamkiewicz J, Kaddatz K, Rieck M, Wilke B, Müller-Brüsselbach S, Müller R. *Proteomic profile of mouse fibroblasts with a targeted disruption of the peroxisome proliferator activated receptor-beta/delta gene*. Proteomics. 2007 Apr;7(8):1208-16.
- Fauti T, Müller-Brüsselbach S, Kreutzer M, Rieck M, Meissner W, Rapp U, Schweer H, Komhoff M, Müller R. *Induction of PPARbeta and prostacyclin (PGI2) synthesis by Raf signaling: failure of PGI2 to activate PPARbeta*. FEBS J. 2006 Jan;273(1):170-9. Erratum in: FEBS J. 2006 Feb;273(3):669-71.

*Co-Erstauterschaft

8.4 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich hier bei Prof. Dr. Rolf Müller für die vertrauensvolle Aufnahme am IMT sowie für die Überlassung dieses spannenden und abwechslungsreichen Promotionsthemas bedanken. Ihm und Dr. Sabine Müller-Brüsselbach gilt auch mein besonderer Dank für die gute und kompetente Betreuung, die freundliche Arbeitsatmosphäre sowie die vielen konstruktiven Anregungen aber auch für die Freiheiten, die sie mir eingeräumt haben, um meinen wissenschaftlichen Geist weiter zu entfalten. Ferner möchte ich mich auch für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts bedanken.

Ebenfalls recht herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen derzeitigen und ehemaligen Arbeitskolleginnen im „Mädels-Labor“ (Kerstin Kaddatz, Margitta Alt, Simone Ries, Josefine Stockert, Sabine Müller-Brüsselbach, Tanja Fauti und Mihaela Kreutzer) nicht nur für die tatkräftige Unterstützung in hektischen Zeiten, sondern vor allem für die freundschaftliche und lustige Arbeitsatmosphäre und die aufmunternden Worte wenn dem „molekularbiologische Voodoo“ mal wieder eine „schlechte Mondphase“ zugrunde lag. Aber auch für die vielen anregenden Diskussionen und nützlichen Tipps rund um den Laboralltag, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Als „Quotenmann“ war es vielleicht nicht immer leicht, aber auch nie wirklich schwierig und meistens hat es sehr viel Spaß gemacht. ☺

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Dr. Wolfgang Meißner, der mir jederzeit mit wertvollen Tipps zur Verfügung stand und in unseren zwischenzeitlich regelmäßigen Freitags-Diskussionen immer mit konstruktiver Kritik und neuen Anregungen über moralische Tiefs hinweg geholfen hat. Zwar können „schlechte“ bzw. unerwartete Ergebnisse am Freitag einen das Wochenende vermiesen, jedoch haben mir unsere Gespräche immer auch einen neuen Motivationsschub gegeben, um am Wochenbeginn wieder voll durch zu starten. Auch für das zur Verfügung stellen der *Microarray*-Daten, der Unterstützung bei den „*high performance*“ Western Blots und nicht zuletzt die süße kulinarische Rundum-Verpflegung sei an dieser Stelle nochmal ausdrücklich gedankt.

Bei Dr. Wolfgang Meißner, Margitta Alt, Kerstin Kaddatz, Simone Ries, Christina Belohlavek und Vanessa Schorn möchte ich mich an dieser Stelle auch nochmal ganz herzlich für das schnelle und kritische Korrekturlesen des Manuskriptes bedanken.

An Dr. Jürgen Adamkiewicz und Bernhard Wilke sowie den weiteren Kollegen aus „Jürgens Labor“ geht ein großes „Danke schön“ für die gute Zusammenarbeit, für die zur Bereitstellung der Proteomicsdaten sowie von diversen qPCR Primern und cDNAs. Für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Bernd Stahl und Klaus Weber bedanken.

Nicht vergessen, und mich recht herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei unserer Sekretärin Ulrike Schülke, die mir auch an stressigen Tagen jederzeit mit Rat und Tat bei der Bewältigung des für mich oft undurchschaubaren universitären Bürokratismus zur Verfügung stand und auch meine ein oder andere kurzfristige Sonderbestellung immer rechtzeitig auf den Weg brachte.

Insgesamt war es eine richtig schöne Zeit mit euch im IMT, auf die ich immer gerne zurückblicken werde!

Allen anderen Arbeitskollegen aus dem IMT aus der AG Suske AG, Krebber, AG Bastians, AG Eilers, AG Brehm und AG Bauer möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die oftmals unbürokratische Hilfe im Austausch von Versuchsprotokollen und Materialien danken. Bei Prof. Dr. Uta-Maria Bauer möchte ich mich zudem für die hilfreichen Anregungen im Thesis Komitee bedanken.

Mein weiterer Dank geht an alle meine Freunde und meine Familie, die an mich geglaubt und mir stets den Rücken gestärkt haben. Vor allem für ihr Verständnis, für die oft nur wenige Zeit die ich mit ihnen Verbringen konnte möchte ich hier „Danke“ sagen. Diese angenehme Abwechslung vom Laboralltag war mir auch immer eine Kraftspende, ohne die sich die Durchführung dieser Arbeit mit Sicherheit schwieriger gestaltet hätte.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Freundin Vanessa Schorn von ganzem Herzen bedanken, dafür, dass sie in den vergangenen Jahren immer für mich da war und da ist, mir in Hochs und Tiefs mit Verständnis zur Seite stand und mich ertragen hat. Ihre moralische Unterstützung und Liebe war ein entscheidender und wichtiger Grundstein bei der Entstehung dieser Arbeit.

Mein letzter Dank geht an alle diejenigen, die ich bisher nicht aufgeführt habe und die auf ihre ganz eigene Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Markus Rieck geboren am 18.04.1979 in Königswinter, ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Regulation der Transkription durch PPAR β/δ in Zelltypen des Tumorstroma*“ im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung unter Leitung von Prof. Dr. R. Müller ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegende Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht: EMBO Journal, FEBS Journal, Journal of Molecular Biology und Proteomics.

Marburg, den _____, _____